



# Vers l'imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la maladie d'Alzheimer : du radiotracteur au modèle animal.

Mathieu Verdurand

## ► To cite this version:

Mathieu Verdurand. Vers l'imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la maladie d'Alzheimer : du radiotracteur au modèle animal.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00348975

**HAL Id: tel-00348975**

**<https://theses.hal.science/tel-00348975>**

Submitted on 22 Dec 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Claude Bernard – Lyon 1**

**Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard – Lyon 1**

(Arrêté du 7 août 2006)

Ecole doctorale : Neurosciences et Cognition

Soutenue publiquement le 13 Octobre 2008

**Par Mathieu Verdurand**

**Vers l'imagerie TEP de la neurotransmission  
sérotoninergique dans la maladie d'Alzheimer : du  
radiotraceur au modèle animal.**

Jury

Dr. Sylvie Chalon, Tours

Dr. Yves Charnay, Genève

Dr. Benoît Delatour, Orsay

Dr. Pierre Krolak-Salmon, Lyon

Dr. Didier Le Bars, Lyon

Pr. Luc Zimmer, Lyon

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

## Liste des articles se rapportant à la thèse

**Verdurand M**, Bérod A, Le Bars D, Zimmer L (2008). Effects of the amyloid-beta peptides on the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat hippocampus (en soumission pour *Neurobiol Aging*).

**Verdurand M**, Bort G, Tadino V, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L (2008). An automated radiosynthesis of the Pittsburgh compound B ([<sup>11</sup>C]PIB) using a commercial synthesizer. *Nucl Med Comm* 29(10):920-6.

Tang S\*, **Verdurand M\***, Joseph B, Lemoine L, Daoust A, Billard T, Fournet G, Le Bars D, Zimmer L (2007). Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [<sup>18</sup>F]12ST05 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand. *Nucl Med Biol* 34:995-1002. (\*participation égale à cet article).

## Autres articles

Riad M, Rbah L, **Verdurand M**, Aznavour N, Zimmer L, Descarries L (2008). Unchanged density of 5-HT(1A) autoreceptors on the plasma membrane of nucleus raphe dorsalis neurons in rats chronically treated with fluoxetine. *Neuroscience* 151(3):692-700.

Desbrée A, **Verdurand M**, Godart J, Dubois A, Mastrippolito R, Pain F, Pinot L, Delzescaux T, Gurden H, Zimmer L, Lanièce P (2008). The potential of the radiosensitive intracerebral probe to monitor the <sup>18</sup>F-MPPF binding in mouse hippocampus *in vivo*. *J Nucl Med* 49(7):1155-61.

## Communications affichées

**Verdurand M**, Bérod A, Le Bars D, Zimmer L. Effects of amyloid-β peptides on the regional distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat brain. World Molecular Imaging Congress, September 10-13, 2008. Abstract 648 accepté.

Lemoine L, **Verdurand M**, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, Zimmer L (2008). Synthesis, fluorine-18 labelling and radiopharmacological evaluation of F15599, a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist. *J Nucl Med* 49(Suppl.1):285P.

Tang S, **Verdurand M**, Lemoine L, Daoust A, Billard T, Zimmer L, Le Bars D. Radiomarquage au <sup>18</sup>F et évaluation biologique de ligands des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. 7ème Colloque Francophone sur la Chimie Organique du Fluor, La Rochelle, avril 2008.

**Verdurand M**, Sentenac S, Le Bars D, Bérod A, Zimmer L. Effect of beta-amyloids on the regional distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat brain. *Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique, Clermont-Ferrand, 9-11 avril 2008* (p289).

**Verdurand M**, Sentenac S, Le Bars D, Zimmer L. Modifications de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer. *Rencontres scientifiques de l'IFNL, Institut Lumière, 10 déc 2007*.

**Verdurand M**, Tang S, Lemoine L, Billard T, Le Bars D, Zimmer L. Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [<sup>18</sup>F]12ST05 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand. *Rencontres scientifiques de l'IFNL, Institut Lumière, 10 décembre 2007*.

Tang S, **Verdurand M**, Billard T, Lemoine L, Zimmer L, Le Bars D (2007). Synthesis of <sup>18</sup>F radiolabelled 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist for PET imaging. *J Label Compd Radiopharm*, 50, S1, pS291.

Tang S, **Verdurand M**, Joseph B, Billard T, Fournet G, Lemoine L, Zimmer L, Le Bars D (2007). Fluorine- 18 labelling and preliminary biological evaluation of a N-(phenyl sulfonyl)indole derivative, 12ST05 as 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *J Label Compd Radiopharm*, 50, S1, pS292.

**Verdurand M**, Bort G, Tadino V, Tourvieille C, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L (2007). An automated radiosynthesis of the  $\beta$ -amyloid imaging radiotracer N-methyl-(<sup>11</sup>C)2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ((<sup>11</sup>C)PIB). *J Label Compd Radiopharm*, 50, S1, pS145.

Zimmer L, Riad M, Rbah L, Aznavour N, **Verdurand M**, Sibon I, Descarries L. Exploration *in vivo* de l'internalisation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub> lors d'un traitement antidépresseur : apport de l'imagerie TEP. 2<sup>ème</sup> Colloque Méditerranéen des Neurosciences, Marrakech 13-15 décembre 2006. En ligne (SP9\_5).

Riad M, Rbah L, **Verdurand M**, Aznavour N, Zimmer L, Descarries L. Functional plasma membrane 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors are replaced by desensitized receptors in the nucleus raphe dorsalis of rats chronically treated with fluoxetine. *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2006*. En ligne.

Rbah L, **Verdurand M**, Riad M, Descarries L, Zimmer L. Exploration *in vivo* de l'internalisation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub> lors d'un traitement antidépresseur. 7ème Colloque de la Société des Neurosciences. Lille 17-20 mai 2005.

# Remerciements

La majorité de ces travaux thèse a été effectuée au CERMEP, Imagerie du vivant. Je remercie donc tout d'abord **Gérard Gimenez** de m'avoir accueilli au sein du centre.

Je suis très reconnaissant à **Sylvie Chalon** et **Yves Charnay** d'avoir accepté de lire, examiner et juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également **Benoît Delatour**, **Pierre Krolak-Salmon** et **Didier Le Bars** pour avoir accepté de participer à mon jury et d'examiner ce travail.

Je veux remercier tout particulièrement **Luc Zimmer** d'avoir encadré ce travail de thèse. Merci pour la confiance que tu m'as accordée durant ces 5 années. Travailler sous ton encadrement fut très agréable. Merci pour ton intuition scientifique, pour ta disponibilité, ta persévérance, pour ta bonne humeur, ton humour et pour tes qualités humaines indéniables. Merci "père" (qualificatif que certaines personnes, dont je ne dénoncerai pas l'identité ici (LR et VG), t'ont attribué à mon égard).

Je tiens à remercier **Vincent Tadino** pour avoir initié avec Luc mon début de thèse, et pour m'avoir formé sur les automates de radiosynthèses au carbone 11. Enfin, je devrais plutôt dire au bidouillage de vannes, au changement de carte électronique, à la soudure, au remplacement de contrôleur de flux, de four triflate...etc... Ce fut un plaisir que de bosser avec toi, le "cowboy" de la radiochimie.

Je remercie "Advanced Accelerator Applications" pour avoir financé ces travaux de thèse CIFRE. Merci à **Laurent Lemoucheux** pour être venu spécialement de Saint-Genis Pouilly pour une synthèse. Je remercie également Bioscan pour avoir financé mon congrès à Aachen.

Je veux remercier **Didier Le Bars**, pour m'avoir ouvert les portes du département radiochimie. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur, ton humour, tes conseils, et ta vision de la recherche. Ce fut un plaisir que de partager ces quelques aventures radiochimiques (et biologiques!) avec toi.

Je tiens à remercier particulièrement **Anne Bérod** pour m'avoir formé et encadré pour toutes les manip de neuroanatomie. Merci Anne pour le temps que tu m'as consacré, pour ton aide, tes précieux conseils, tes réflexions et nos discussions. Ce fut très agréable et enrichissant.

Je tiens à remercier **Sandor Arancibia** pour m'avoir fourni le modèle de rats amyloïdes A $\beta$  (25-35). Merci également à **Gina Devau** pour les échantillons de cerveaux microcèbe.

Un grand merci à **Sandrine Tang** pour notre travail commun sur le traceur des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, qui n'a malheureusement pas eu le succès escompté. Merci Sandrine pour ta sympathie. Merci également à **Thierry Billard**, pour tes conseils, pour le partage de tes connaissances en chimie, pour les bouquins pdf et merci pour ta bonne humeur et ta sympathie.

Je remercie **Sabine Sentenac** pour les dosages de sérotonine tissulaire. Merci Sabine pour tes réparations de dernière minute, et merci pour ta gentillesse.

Merci à **Aurélien Desbrée** pour la collaboration sur le projet "beta-microprobe souris" et pour ta sympathie.

**Je voudrais remercier tout le personnel du CERMEP pour ses multiples compétences. Je crois avoir pu bénéficier de l'aide précieuse de chacun d'entre vous, et je vous en remercie.**

**Christian Tourvieuille**, merci Cricri (ou encore le "McGyver" du Cermep) pour les réparations sur l'automate de méthylation, pour ton humour et ta sympathie.

**Frédéric Bonnefoi**, merci Fred pour ton aide et tes conseils lors de ma galère avec l'automate de méthylation et les radiosynthèses du PIB, pour les tirs cyclo quand Cricri n'était pas là, et pour ta sympathie.

**Marion Alvarez**, merci Marion pour tes synthèses de MPPF, celles prévues et celles rajoutées au dernier moment, pour ta prévoyance et ta gentillesse.

**Stéphane Guillouet**, merci Stéphane pour tes conseils pour les synthèses de PIB, ton aide et ta disponibilité.

Merci à **Fabienne Poncet**, **Véronique Berthier** et **Christine Vighi** pour m'avoir tenu informé des ajouts et annulations d'examens TEP MPPF, pour la préparation de la salle avant l'examen TEP chat, pour votre aide concernant le matériel de labo et pour votre gentillesse.

**Christian Pierre**, merci à toi pour être allé chercher en urgence une pièce informatique pour assurer ma manip  $\beta$ -microprobe. Merci pour ton aide, ton humour et ta sympathie. Et les bons souvenirs à la sortie ski (1<sup>er</sup> prix des plus belles chaussures!).

**Anthonin Reilhac** et **Nicolas Costes**. Merci à tous les deux pour votre aide pour le traitement des images TEP chat et pour votre sympathie.

Merci à **Franck Lavenne**, pour ton aide "déterminante" au moment d'imprimer ma thèse en couleur !

Merci à **Bruno**, **Rachid**, **Dominique**, **Danielle**, **Alain**, **Bassem**, **Mohamed**, **Mimoun**, **Jacques**.

Merci à **Luc Magnier** (pour les manips  $\beta$ -microprobe souris et pour les grosses compresses), **Stéphane Martin** (pour les manips microTEP) et **Jean-Baptiste Langlois**, pour nos collaborations, pour votre aide, votre bonne humeur et votre sympathie.

**Je voudrais remercier toutes les personnes du laboratoire de Neuropharmacologie de Rockefeller avec qui j'ai pu interagir.** Hélène Scarna, Laura Lambas-Senas, Christianne Bardelli, Jean-Baptiste Bertrand, Ouissame Mnie-Filali, Sandrine Parrot, Shalah, Nasser Hadjerri et tous les autres que j'oublie...

Ces cinq années m'ont permis de faire de très belles rencontres. J'ai croisé, écouté, discuté, partagé, taquiné, rigolé... Au fil du temps, il y a certaines personnes qui sont devenues plus que des "collègues de travail"...

**Veronica,**

The doe ! Je te dis un "HUGE" merci pour ta joie de vivre communicative, pour ton sourire, pour ta sincérité, pour ta spontanéité, pour nos fous-rires et pour ta dérision sur tout. Merci pour ton aide avec les ratatons et les chatons. Maintenant que tu gères la stéréotaxie, la chirurgie et la suture toute seule...prends garde à LZ qui va te confier du boulot en plus !!! Bon et sinon, quand est-ce qu'on se fait les vias ferrata les plus difficiles de France ?

**Latifa,**

Titi, je veux d'abord te dire merci pour ton accueil, pour m'avoir patiemment transmis ton savoir, et merci pour tous tes conseils passés, présents et futurs. Je voudrais ensuite te dire sincèrement merci pour ton amitié (à toutes épreuves), pour nos échanges, nos discussions et pour nos fous-rires. A part ça, voyant ta progression fulgurante à ski, grâce à un moniteur de renommée...départementale (quand même), j'espère qu'un jour on pourra dévaler des pistes noires ensembles !

**Jamila,**

Merci pour ton aide spontanée et pour tous les services que tu m'as rendus. Merci également pour ta gentillesse, pour tes conseils avisés et pour ta générosité. Tu restes pour moi l'électron libre pétillant du Cermepe !

**Laëtitia,**

Merci pour proposer spontanément ton aide pour les manips, pour avoir toujours une idée de sortie, pour ta sincérité et pour nos fous-rires (notamment provoqués par tes "accidents quotidiens")... Je suis encore étonné que tu sois revenue (presque) entière des sorties via ferrata ! "The buffoon" te souhaite bon courage pour ta thèse avec ton nouveau "papa".

**Alexia,**

Merci pour ton aide pour les manips d'injections, pour ta spontanéité, ton dynamisme et les fous-rires partagés. Le groupe "urethane" va pouvoir renaître pour quelques jours ! Bon courage pour la suite de la voie que tu as choisies.

**Guillaume,**

Merci à toi le Toulousain pour avoir rejoint l'aventure (la galère ?) des automates de radiosynthèses et du PIB. Merci pour ton aide, tes idées de chimistes, ta bonne humeur, nos fous-rires et nos expériences, pas toutes très scientifiques. Je garde d'excellents souvenirs des courses de fauteuils roulants, des pétanques nocturnes et des soirées de percussions après avoir fini nos journées de galère avec l'automate dans la nuit. Bon courage pour ta thèse !

**Nicolas,**

Merci pour ton aide en informatique, pour tes conseils passés et présents, pour nos discussions scientifiques ou non et pour nos fous-rires. Merci également pour toutes les sorties sports...ça fait des bons souvenirs de doigts cassés (ski), de chutes et de galère (VTT) et autres (kayak).

**Anthony,**

Merci Abou pour ta spontanéité, pour nos délires et nos fous-rires.

Et je n'oublie pas **Anissa** et **Nadia**. Merci pour les bons moments passés et pour votre sympathie.

Je voudrais enfin remercier les personnes les plus importantes à mes yeux.

Les personnes avec lesquelles je me sens si bien... autour d'un whisky écossais (les gènes Chisholm s'expriment), de bas-armagnac, ou de la dernière trouvaille en vin de Mich. Ahhh, de vrais alcooliques dans cette famille Verdurand !

Mes parents **Mich et Sue**, pour votre soutien inconditionnel, pour les valeurs que vous m'avez inculqué qui me servent chaque jour comme référence.

Ma grande sœur **Elo**, et la famille qui s'est aggrandie avec **Stéphane et Manon** pour les bons moments ensemble passés, présents et futurs, tout simplement.

Et mon "petit" frère **Alex**, pour...pour...bein je ne sais pas trop quoi dire en fait. C'est mon fréro quoi! On se comprend sans se parler.

Et toute ma grande famille, française et canadienne !

A Georges, Arthur et Ken



## Liste des abréviations

[ <sup>11</sup> C]PIB :	2-(4'-méthylaminophényl)-6-hydroxybenzothiazole marqué au carbone 11
[ <sup>18</sup> F]12ST05 :	<i>N</i> -[2-(1-[(4-fluorophényl)sulfonyl]-1H-indol-4-yloxy)éthyl]- <i>N,N</i> -diméthylamine marqué au fluor 18
[ <sup>18</sup> F]MPPF :	(4-2'-méthoxyphényl)-1-[2'-( <i>N</i> -2-pyridinyl)- <i>p</i> -fluorobenzamido]-éthylpiperazine marqué au fluor 18
[ <sup>18</sup> F]F15599 :	(3-chloro-4-fluorophényl)-(4-fluoro-4{[(5-méthyl-pyrimidin-2-ylméthyl)-amino]- méthyl}-piperidin-1-yl)-methadone)
[ <sup>11</sup> C]CH <sub>3</sub> OTf :	trifluorométhanesulfonate de méthyle marqué au carbone 11
5-HT :	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5,7 DHT :	5,7 dihydroxytryptamine
Aβ :	peptides beta-amyloïdes
AINS :	anti-inflammatoires non-stéroïdiens
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
apoE :	apolipoprotéine Epsilon
APP :	"amyloid precursor protein" en anglais (précurseur de la protéine amyloïde)
ARNm :	acide ribonucléique messager
AS :	activité spécifique
BHE :	barrière hémato-encéphalique
Bq :	Becquerel
Cing :	cortex cingulaire
CDR :	"clinical dementia rating" en anglais (échelle d'évaluation clinique démentielle)
Da :	Daltons
DG :	"dentate gyrus" ou gyrus denté
DNF :	dégénérescences neurofibrillaires
ECD :	éthylcystéinate dimère
eV :	électron Volts
GABA :	acide gamma-amino-butyrique
GPCR :	"G protein coupled receptors" en anglais (récepteurs couplés aux protéines G)
GTP :	guanosine tri-phosphate
Hipp Dors :	hippocampe dorsal
Hipp Ventr :	hippocampe ventral
HMPAO :	hexaméthylpropylène amine oxyde
icv :	intra-cérébro-ventriculaire
ip :	intra-péritonéal
iv :	intra-veineux
IRM :	imagerie par résonance magnétique
Kd :	constante d'association à l'équilibre
Ki :	constante d'inhibition à l'équilibre
LCR :	liquide céphalo-rachidien
MA :	maladie d'Alzheimer
MCI :	"mild cognitive impairment" en anglais (trouble cognitif léger)
MMSE :	"mini-mental state examination" (test clinique des capacités cognitives)
NFT :	"neurofibrillary tangles" en anglais (= DNF)
NMDA :	<i>N</i> -méthyl-D-aspartate
NRD :	nucleus raphe dorsalis (noyau du raphé dorsal)
pCPA :	4-chloro-DL-phénylalanine éthylester hydrochloride
PHF :	"paired helical fragments" en anglais (filaments en hélices appariés)
PS :	présénillines
SNC :	système nerveux central
SP :	"senile plaques" en anglais (plaques séniles ou plaques amyloïdes)
TEP :	tomographie par émission de positons

<b>Introduction .....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre 1 - La maladie d'Alzheimer.....</b>	<b>15</b>
A. Définition et généralités .....	15
B. L'étiologie et l'épidémiologie .....	16
C. Le support neuroanatomique.....	17
D. La progression des lésions .....	21
E. La thérapeutique.....	23
1. La thérapeutique actuelle .....	23
2. La recherche thérapeutique.....	25
F. Le diagnostic .....	27
1. Le diagnostic actuel.....	28
2. Le concept de trouble cognitif léger (MCI).....	29
3. La mise à jour des critères diagnostiques .....	30
4. Le diagnostic de certitude <i>post-mortem</i> .....	30
<b>Bibliographie .....</b>	<b>32</b>
<b>Chapitre 2 - Du radiotraceur à l'imagerie TEP des plaques amyloïdes.....</b>	<b>39</b>
<b><i>I. Rappels bibliographiques.....</i></b>	<b><i>39</i></b>
A. Principe de l'imagerie TEP .....	39
1. La production des radiotraceurs TEP .....	39
2. Le principe de détection.....	42
B. Les radiotraceurs TEP des plaques amyloïdes .....	44
1. Les plaques amyloïdes comme cible moléculaire .....	44
2. Les critères pour un radiotraceur TEP cérébral.....	45
3. Les molécules candidates .....	47
4. La liaison aux fibrilles A $\beta$ .....	51
C. L'imagerie préclinique.....	51
D. L'imagerie clinique .....	52
<b><i>II. L'automatisation de la radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]PIB .....</i></b>	<b><i>57</i></b>
A. Contexte .....	57
1. La radiosynthèse originale.....	57
2. L'utilisation du triflate de méthyle.....	58
3. L'utilisation d'une boucle HPLC .....	59
B. Objectifs.....	60
C. Matériels et Méthodes .....	60
D. Résultats.....	64
1. Automate de méthylation (Mel-Plus™, Bioscan®) .....	64
2. Boucle de synthèse (AutoLoop™, Bioscan®).....	66
E. Discussion .....	70
1. L'automate de méthylation (Mel-Plus™, Bioscan®) .....	70
2. La boucle de synthèse (AutoLoop™, Bioscan®).....	72
F. Conclusion .....	74
<b>Bibliographie .....</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 3 - Imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la MA.....</b>	<b>81</b>
<b><i>I. Rappels bibliographiques.....</i></b>	<b><i>81</i></b>
A. La neurotransmission sérotoninergique.....	81
1. La sérotonine .....	81
2. L'anatomie du réseau sérotoninergique cérébral.....	82
3. Les récepteurs sérotoninergiques .....	84
B. La neurotransmission sérotoninergique dans la MA.....	86

<b>II. Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et la MA</b>	<b>89</b>
A. Contexte	89
1. La distribution des récepteurs 5-HT <sub>6</sub>	89
2. Les outils pharmacologiques pour étudier les récepteurs 5-HT <sub>6</sub>	90
B. Objectifs	92
C. Matériels et Méthodes	93
1. La radiosynthèse du [ <sup>18</sup> F]12ST05	93
2. Les animaux	97
3. Lipophilie <i>in vitro</i> et pénétration cérébrale <i>ex vivo</i>	98
4. L'autoradiographie	98
5. L'imagerie TEP chez le chat	100
D. Résultats	101
1. Synthèse chimique et radiomarquage	101
2. Lipophilie <i>in vitro</i> et pénétration cérébrale <i>in vivo</i>	102
3. Autoradiographies <i>in vitro</i> chez le rat	103
4. Autoradiographies <i>ex vivo</i> chez le rat	104
5. Imagerie TEP chez le chat	106
E. Discussion	107
F. Conclusion	110
<b>III. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et la MA</b>	<b>111</b>
A. Contexte	111
1. La distribution des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub>	111
2. Les outils pharmacologiques pour étudier les récepteurs 5-HT <sub>1A</sub>	113
3. L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub>	113
4. L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> et de la MA	117
B. Objectifs	119
C. Matériels et Méthodes	120
1. Les radiosynthèses	120
2. Les animaux	121
3. L'anesthésie	121
4. Les modèles animaux	122
5. L'imagerie microPET chez le rat	126
6. L'autoradiographie	127
7. Le dosage tissulaire de la sérotonine	128
8. La neuroanatomie	129
D. Résultats	133
1. Le modèle d'injection intrahippocampique de peptides Aβ (1-40)	133
2. Les autres modèles d'injection intracérébrale de peptides amyloïdes	145
3. Le modèle de déplétion sérotoninergique	148
4. Le modèle de dénervation sérotoninergique	150
E. Discussion	152
1. Le choix du modèle d'injection intrahippocampique de peptides amyloïdes chez le rat	152
2. La microTEP ne détecte aucune modification de l'expression des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> <i>in vivo</i>	154
3. La fixation du [ <sup>18</sup> F]MPPF <i>in vitro</i> est augmentée 7 jours après l'injection des peptides Aβ (1-40)	154
4. L'augmentation de la fixation du [ <sup>18</sup> F]MPPF <i>in vitro</i> : conséquence d'une diminution de la sérotonine endogène ?	155
5. Les récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> surexprimés ne sont pas couplés aux protéines G	155
6. Quelle sous population cellulaire surexprime ces récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> ?	157
7. La surexpression des récepteurs 5-HT <sub>1A</sub> est transitoire	163
8. Et les autres formes de peptides amyloïdes ?	166

F. Conclusion et perspectives.....	167
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>169</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>171</b>



# Introduction

La maladie d'Alzheimer (MA) est une démence neurodégénérative dont, à l'heure actuelle, aucune thérapeutique curative ne peut être proposée aux patients. L'étiologie de la MA demeure inconnue mais ses caractéristiques physiopathologiques sont bien décrites. Alors que les dégénérescences intracellulaires de protéines tau sont corrélées au déclin cognitif, il est admis que l'accumulation extracellulaire de peptides amyloïdes s'installe plusieurs années avant que des signes cliniques apparaissent. D'autre part, il existerait un continuum progressif entre l'apparition des premiers troubles cognitifs (stade MCI pour "mild cognitive impairment") et le développement d'une MA. Des processus neurotoxiques silencieux se développent donc bien avant que le diagnostic soit porté par des tests neuropsychologiques en clinique. Malgré les (très) nombreux travaux entrepris à ce jour, les relations temporelles précises reliant l'émergence des signes cliniques et histo-pathologiques au cours de la maladie avec les systèmes de neurotransmission potentiellement impliqués dans cette pathologie, demeurent sujets à controverse. Ainsi, la précocité et la spécificité du diagnostic constituent des facteurs cruciaux tant pour la prise en charge de la MA que pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques.

Les travaux effectués au cours de cette thèse CIFRE se positionnent dans cette optique d'un diagnostic précoce de la MA, par le développement des méthodologies de l'imagerie TEP (tomographie par émissions de positons). Ces travaux s'articulent autour de trois études principales.

Dans une première partie, après un rappel sur le développement de l'imagerie TEP des plaques amyloïdes, (1) une première étude méthodologique va présenter **les travaux d'automatisation et d'optimisation de la radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]PIB**, un radiotraceur pouvant détecter l'accumulation des peptides amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de la MA. Cette approche doit permettre de synthétiser ce radiotraceur TEP plusieurs fois par jour si l'activité préclinique et/ou clinique le nécessite et ainsi rendre plus accessible un outil d'aide au diagnostic et d'évaluation de nouvelles thérapeutiques.

Dans une seconde partie, nous allons nous intéresser à l'imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la MA. La neurotransmission cholinergique et la neurotransmission glutamatergique sont classiquement décrites comme diminuées chez les patients Alzheimer et la recherche neuropharmacologique s'est fortement focalisée sur ces deux systèmes de neurotransmission. Cependant, les améliorations cliniques modestes sous anticholinestérasiques ou antagoniste glutamatergique rappellent que ces neurotransmissions ne sont pas les seules à devoir être corrigées.

Ainsi, les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont démontré des propriétés procognitives, processus particulièrement affectées dans la MA. D'autre part, des études *post-mortem* montrant leur modification confirment qu'il s'agit d'une cible pertinente dans le cadre de la MA. Cependant, aucun centre ne dispose encore d'un radiotraceur spécifique permettant l'imagerie TEP *in vivo* de ces récepteurs. (2) Les travaux de thèse que nous allons présenter s'inscrivent dans le cadre de **l'évaluation biologique d'une nouvelle molécule potentiellement radiotraceuse des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>**. Le premier objectif, en collaboration étroite avec un laboratoire de chimie de l'université Lyon 1 (Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR CNRS 5246), va être de réussir le radiomarquage d'une molécule précurseur sélectionnée pour ses caractéristiques *in vitro* envers les 5-HT<sub>6</sub>. Le second, concernant plus particulièrement cette thèse, va consister à mener les expériences de validation biologique préclinique par imagerie isotopique, afin de proposer, à terme, un radiotraceur 5-HT<sub>6</sub> transposable à l'homme.

D'autre part, une étude récente en imagerie TEP au [<sup>18</sup>F]MPPF, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, a révélé une diminution de la fixation de ce traceur chez des patients Alzheimer alors qu'une augmentation pouvait être constatée chez des patients MCI. Le système sérotoninergique est donc précocement "stimulé" dans la maladie d'Alzheimer. Compte tenu de la difficulté d'interprétation des résultats obtenus en clinique, mes travaux de thèse vont (3) **explorer la neurotransmission sérotoninergique par imagerie TEP préclinique au [<sup>18</sup>F]MPPF, dans un modèle d'injection de peptides amyloïdes** chez le rat, afin d'évaluer sa capacité à reproduire une augmentation transitoire de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. De manière complémentaire, l'évaluation des conséquences de l'injection de ces peptides sur la neuroanatomie, au cours du temps, devrait apporter des éléments de réponses aux mécanismes compensatoires pouvant être stimulés. Finalement, les implications potentielles de ces analyses, sur les thérapeutiques visant à moduler les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, seront abordées et discutées.

# Chapitre 1 - La maladie d'Alzheimer

## A. Définition et généralités

La maladie d'Alzheimer (MA) fait partie des 10 premières causes de mortalité de la population mondiale, plus particulièrement chez les personnes âgées de 65 ans et plus. A travers le monde, on estime à 24,3 millions le nombre de personnes atteintes de la MA (Ferri et al., 2005). Une femme sur six et un homme sur dix, âgé de plus de 55 ans, développera une MA ([http://www.alz.org/national/documents/report\\_alzfactsfigures2008.pdf](http://www.alz.org/national/documents/report_alzfactsfigures2008.pdf)). Cette pathologie est la première cause de démence dégénérative. Sa fréquence augmente avec l'âge: sa prévalence passe de 1 % entre 65 et 69 ans à plus de 15 % au-delà de 85 ans. D'autre part, la population âgée de 85 ans et plus va quadrupler d'ici l'an 2050. Ainsi, la progression de la MA, sa gravité et sa prise en charge lourde, font augmenter de façon exponentielle son coût économique, social et humain.

La MA a été décrite pour la première fois en 1906 par le Dr. Aloïs Alzheimer qui identifia deux lésions cérébrales caractéristiques de la maladie, dans des régions spécifiques du cerveau, l'hippocampe et le cortex cérébral. Ces deux lésions caractéristiques sont décrites sous forme de plaques séniles extracellulaires composés de fragments de 40 et 42 acides aminés (les peptides  $\beta$ -amyloïde ou A $\beta$ ), et d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires causés par l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Tanzi et Bertram, 2005).

La MA est définie comme un syndrome démentiel. Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, la démence se caractérise par *"une altération progressive de la mémoire et de l'idéation, suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie de tous les jours, apparue depuis au moins 6 mois et associée à un trouble d'au moins une des fonctions suivantes : langage, calcul, jugement, altération de la pensée abstraite, praxie, gnosie, ou modification de la personnalité"*. La définition du DSM IV (4<sup>ème</sup> version du "Diagnostic and Statistical Manual" en anglais) d'un syndrome démentiel est un état caractérisé par des déficits cognitifs multiples au sein desquels les troubles de la mémoire sont



prédominants. Ils restreignent l'activité du sujet par rapport à son activité antérieure, et ne sont pas liés à une affection psychiatrique.

La MA n'est pas simplement une maladie de la cognition mais également une maladie du comportement et de la relation à l'autre. Les troubles psycho-comportementaux sont très fréquents et s'observent dans près de la totalité des cas de MA, à un moment donné de leur évolution (Lawlor, 2004). On peut citer, par exemple, l'anxiété et la dépression, l'agressivité et l'agitation, les troubles psychotiques. Ils sont sous-estimés et pourtant, il s'agit de l'un des facteurs les plus lourds pour l'entourage du malade et qui motive la plupart des mises en institution.

## **B. L'étiologie et l'épidémiologie**

L'étiologie de la MA est, à ce jour, inconnue. Sous sa forme sporadique (>90%), elle se retrouve majoritairement chez les personnes âgées de plus de 65 ans. La forme sporadique signifie que la symptomatologie de la maladie intervient sans identification d'un quelconque déterminisme génétique. Cependant, plusieurs mutations génétiques ont pu lui être associées grâce à l'étude de cas familiaux caractérisés par une apparition plus précoce (parfois chez des patients de moins de 25 ans) et une évolution plus rapide. Quatre gènes ont été identifiés. Le gène APP, le gène PS1, le gène PS2 et le gène codant pour l'apoE. Le gène APP ("amyloid precursor protein" en anglais) est situé sur le chromosome 21 et code pour le précurseur de la protéine amyloïde (Goate et al., 1991). Les gènes PS1 (pour préséniline 1) situés sur le chromosome 14 (Sherrington et al., 1995) et les gènes PS2 (présénilline 2) sur le chromosome 2 (Levy-Lahad et al., 1995), codent pour les protéines ( $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases) impliquées dans le complexe enzymatique de clivage de la protéine APP et conduisent à la formation des dépôts et plaques amyloïdes. Cependant, les mutations liées à ces trois gènes n'expliquent que la moitié des formes familiales. La principale mutation semblant constituer un facteur de susceptibilité concerne un gène situé du chromosome 19 codant pour l'apolipoprotéine E (apoE) impliquée dans le métabolisme des lipides. Trois formes alléliques du gène existent dans la population totale (5% de forme  $\epsilon 2$ , 80% de  $\epsilon 3$  et 15 % de  $\epsilon 4$ ) codant pour trois formes différentes d'apoE dont une seule, la forme apoE4, s'est révélée être un facteur de risque présentant la plus grande force d'association avec la MA. Cependant, les mécanismes

biologiques pouvant sous-tendre le rôle de l'apoE sont multiples et restent mal compris (Lahiri, 2004).

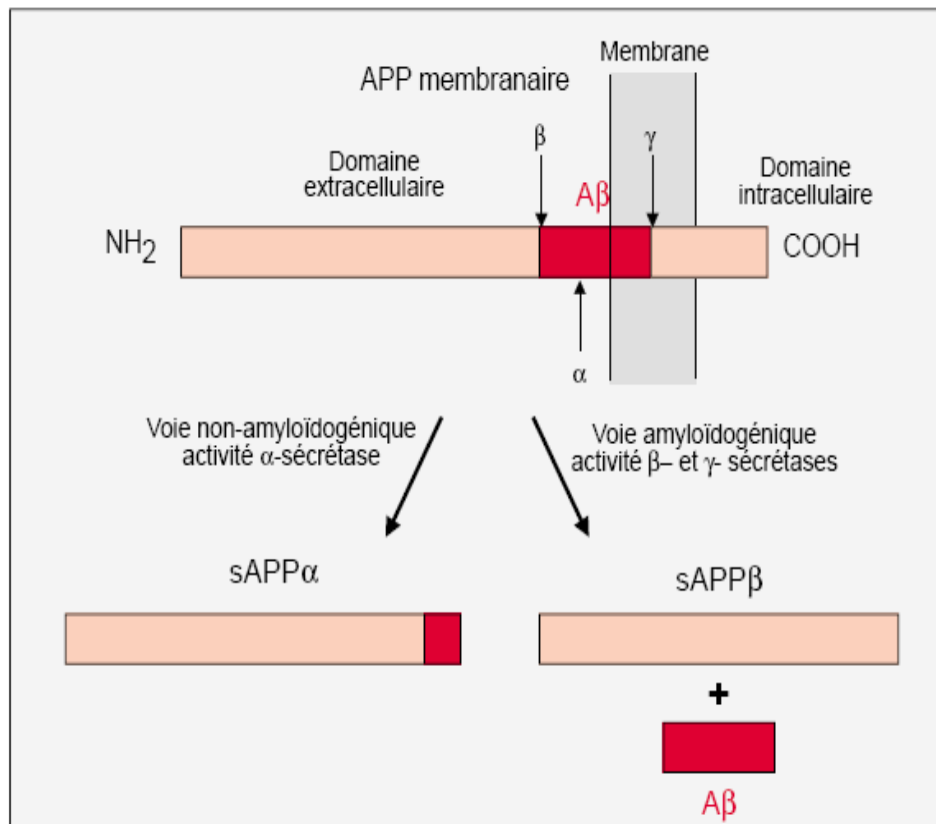
Les études épidémiologiques mettent en lumière une multitude de facteurs de risques et, à l'inverse, de facteurs protecteurs, mais dont les résultats sont à prendre avec précaution. Certains facteurs aggravants sont bien établis comme l'âge et les antécédents familiaux de démence (Jayadev et al., 2008). La prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens (ou AINS) (Vlad et al., 2008) et la consommation modérée de vin (Pinder et Sandler, 2004) sont considérés par certains auteurs comme des facteurs protecteurs. D'autres restent l'objet de controverses du fait de possible biais dans les études: les traumatismes crâniens à répétition, l'âge des parents, le niveau d'éducation, l'aluminium, la consommation de tabac, les traitements hormonaux de la ménopause (Lindsay et al., 2002).

## C. Le support neuroanatomique

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de deux types de lésions cérébrales : les plaques amyloïdes ou plaques séniles (SP pour "senile plaque" en anglais) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF ou NFT pour "neurofibrillary tangles" en anglais), associées à une perte neuronale et synaptique notable.

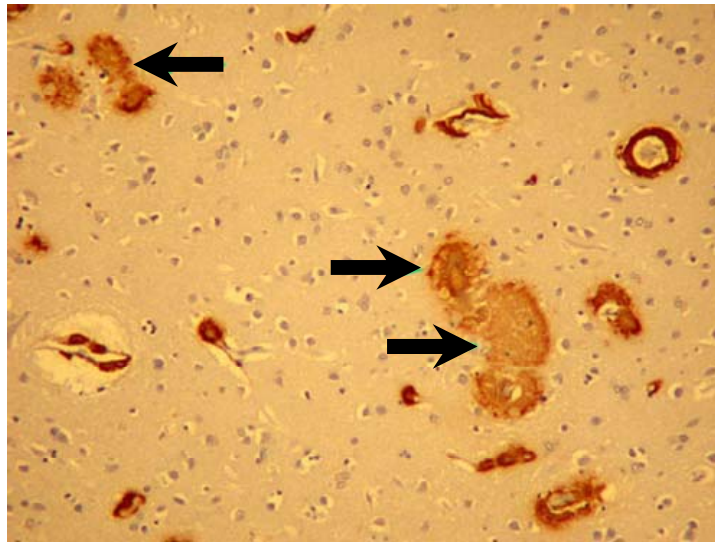
La protéine  $\beta$ -amyloïde ou peptide A $\beta$ , a été initialement isolée à partir de vaisseaux méningés provenant de cas d'angiopathie amyloïde (Husby et al., 1973). Elle est décrite sous une forme courte de 40 acides aminés (A $\beta$  (1-40)) et sous deux formes longues de 42 et 43 acides aminés (A $\beta$  (1-42) et A $\beta$  (1-43)). Ces fragments sont issus du clivage de la protéine précurseur APP plus longue, comportant de 698 à 770 acides aminés. L'APP est majoritairement clivée selon une voie non-amyloïdogénique, faisant intervenir une enzyme appelée l' $\alpha$ -sécrétase et conduisant à un produit soluble (Chapman et al., 2001) (**Fig. 1**). Par contre, il existe une voie minoritaire amyloïdogénique représentée par les enzymes  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases, dont le produit de clivage est insoluble et va se déposer sous différentes formes dans le milieu extracellulaire. Les dépôts diffus de peptide A $\beta$  sont volumineux (plusieurs centaines de micromètres), mal délimités et contiennent essentiellement la forme longue A $\beta$  (1-42). Les dépôts focaux sont sphériques, bien limités et plus petits (environ 60  $\mu$ m). Ils correspondent à un dépôt dense, dont le cœur est majoritairement constitué de la forme courte

A $\beta$  (1-40) du peptide. Lorsque ce dépôt focal est entouré d'une couronne de prolongements nerveux, il réalise la plaque sénile, ou plaque amyloïde (**Fig. 2**).



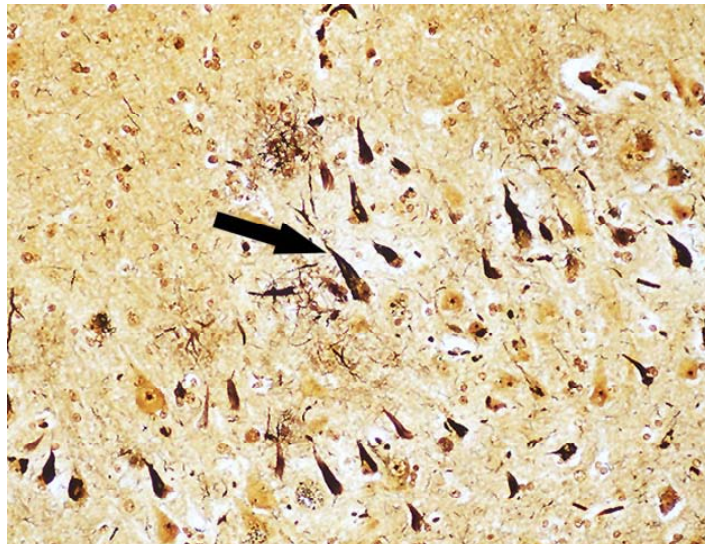
**Figure 1.** Voie de clivage du précurseur de la protéine amyloïde (APP) (d'après [Dodart et al., 1999](#)).

Jusqu'à récemment, il était considéré que l'accumulation extracellulaire de peptides A $\beta$  était la cause d'une désorganisation provoquant une réaction inflammatoire aboutissant à la mort des neurones environnant. Seuls les dépôts d'amyloïdes constituaient des éléments neurotoxiques. Cependant, plusieurs équipes ont démontré, par des études *in vitro*, la toxicité d'oligomères A $\beta$  envers des neurones en culture ([Lambert et al., 1998](#)). D'autre part, la présence des peptides A $\beta$  a pu être mise en évidence à l'intérieur des neurones ([Takahashi et al., 2004](#)). Enfin, une équipe a mis au point un modèle transgénique de rats présentant une accumulation de ces oligomères A $\beta$  à l'intérieur des neurones. Ces rats présentaient des déficits de la mémoire visuelle et une augmentation de la phosphorylation de tau en l'absence de plaques amyloïdes extracellulaires ([Echeverria et al., 2004](#)). D'autre part, des rats triple transgénique (APP/PS1/tau) ont montré un déficit d'activité du protéasome corrélé à la présence intraneuronale d'oligomères A $\beta$  ([Tseng et al., 2007](#)).



**Figure 2.** Images de plaques amyloïdes (flèches noires) marquée par immunohistochimie du peptide  $A\beta$  (tissu cérébral humain) (d'après le site web de [l'Institut National de la Recherche Pédagogique](#)).

Les dégénérescences neurofibrillaires (**Fig. 3**) sont intraneuronales. Elles sont formées par l'accumulation de neurofilaments anormaux dont le principal constituant est une protéine tau anormalement phosphorylée.



**Figure 3.** Dégénérescences neurofibrillaires (flèche noire) mises en évidence par la technique d'imprégnation argentique dans du tissu cérébral humain (d'après le site web de ["l'University of Oklahoma Health Sciences Center"](#)).

La protéine tau est un constituant physiologique des neurofilaments qui se lie aux microtubules formant le cytosquelette des neurones. Des phosphorylations anormales mènent à l'agrégation des protéines en paires de filaments appariés en hélice (ou PHF pour "paired helical filaments" en anglais) au lieu d'une agrégation aux microtubules (Johnson et Stoothoff, 2004). Six isoformes de la protéine tau sont exprimées par épissage-alternatif de l'ARNm à partir d'un seul gène (chromosome 17q21) et toutes sont retrouvées, hyperphosphorylées, dans les PHF (Goedert et al., 2006).

Enfin, la perte neuronale se manifeste par un élargissement des sillons et une diminution du volume des circonvolutions du cortex (atrophie corticale). Les ventricules cérébraux s'en trouvent dilatés. L'hippocampe, structure impliquée dans les fonctions mnésiques, présente précocement une diminution de sa taille (Baron et al., 2001) (Fig. 4).

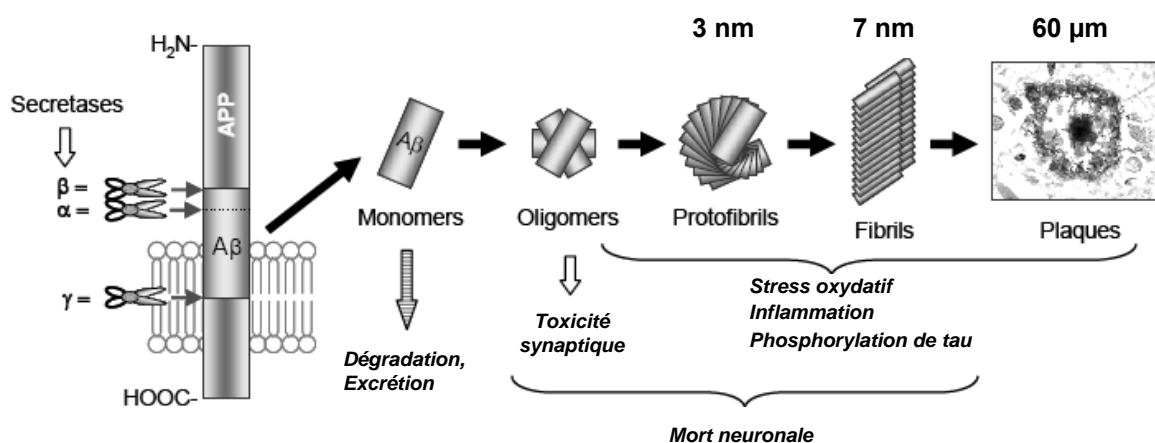


**Figure 4.** Représentation de l'atrophie corticale, hippocampique et de la dilatation ventriculaire dans le cerveau de patient atteint de la MA (hémis-cerveau droit) en comparaison de celui d'un sujet sain (hémis-cerveau gauche) ("<http://www.alz.org/brain/09.asp>").

Les pertes neuronales dans les noyaux sous-corticaux sont également importantes. Ainsi, elles concernent le noyau basal de Meynert (NbM) synthétisant l'acétylcholine, le locus coeruleus (LC) synthétisant la noradrénaline, le noyau du raphé dorsal (NRD) synthétisant la sérotonine et la substance noire (SN) lieu de synthèse de la dopamine (Lyness et al., 2003).

## D. La progression des lésions

Pendant longtemps et encore aujourd'hui dans la communauté scientifique, des débats opposent les équipes favorisant la théorie dite "baptiste" (se référant à  $\beta$ -amyloïde) à celle dite "tauiste" (protéines tau) de l'origine de la MA (Mudher et Lovestone, 2002; Duyckaerts 2004). Les "baptistes" sont les tenants de l'hypothèse de la "cascade amyloïde" qui propose qu'une augmentation de la synthèse (ou une baisse de la dégradation) du peptide  $A\beta$  conduit progressivement à la formation de dépôts diffus, puis de plaques amyloïdes, qui vont initier une réponse inflammatoire, une dégénérescence neurofibrillaire et aboutir finalement à une neurodégénérescence (Hardy et Allsop, 1991; Hardy et Higgins, 1992; Hardy 1992; Selkoe et al., 1999, 2001) (Fig. 5).



**Figure 5.** Schéma représentant la "cascade amyloïde" (d'après Furumoto et al., 2007).

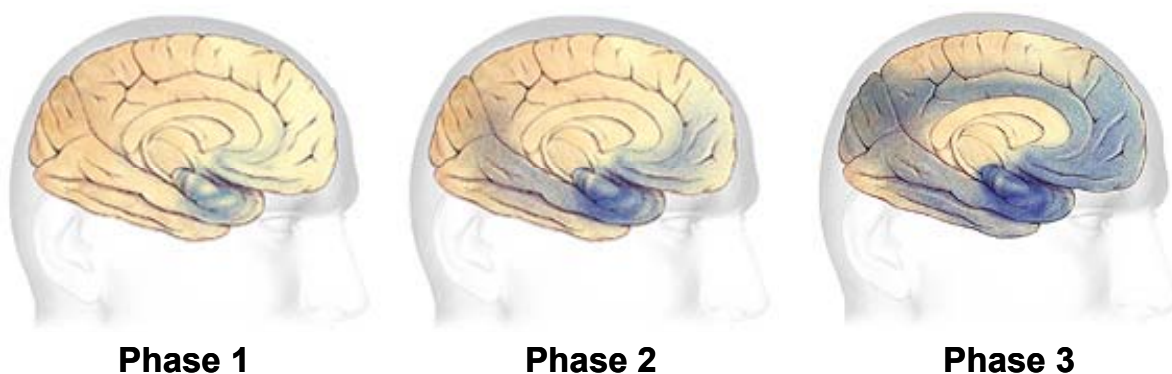
Les "tauistes" proposent que la MA fait partie du groupe des tauopathies, terme désignant les maladies qui ont en commun le fait de comporter des agrégats intra-neuronaux de protéines tau anormalement phosphorylées (Gray et al., 1987; Lovestone et Reynolds, 1997; Mena et al., 1996). Cependant, le fait que des mutations dans le gène codant pour la protéine tau produisent des dégénérescences neurofibrillaires sans plaques amyloïdes (Ishihara et al., 1999, 2001) alors que des mutations dans le gène de l'APP ou PS1 et PS2 sont capables de donner tant des plaques amyloïdes que des DNF (Lewis et al., 2001) semble démontrer que la pathologie amyloïde se situe en amont de la pathologie tau.



Il a été montré que l'évolution ultrastructurale des lésions amyloïdes se fait en trois étapes. (1) Des dépôts diffus de peptide amyloïde sont d'abord retrouvés dans les parties basales des cortex frontaux, temporaux et occipitaux. (2) Ce sont ensuite des plaques séniles qui sont localisées dans les régions supérieures du néocortex et dans l'hippocampe. (3) Et enfin, des plaques amyloïdes en densité élevée se répartissent dans tout le cortex mais également dans les régions sous-corticales comme le striatum, le thalamus, l'hypothalamus et les noyaux profonds. La progression des lésions amyloïdes n'est pas corrélée à la nature des symptômes de la maladie d'Alzheimer.

La pathologie tau s'appuie sur un pattern d'évolution des dégénérescences neurofibrillaires en stades bien identifiés (Braak et al., 1994; Delacourte et al., 1999, 2002), reproductibles et corrélés à l'évolution des signes cliniques de la maladie (Nagy et al., 1995). Les premiers stades sont communs avec l'histologie du vieillissement normal avec une apparition d'une DNF dans la région transentorhinal. Dans les stades suivants, la DNF atteint le cortex entorhinal, la formation hippocampique et l'amygdale. Elle s'étend ensuite aux régions néocorticales puis aux cortex sensoriels et moteurs du néocortex.

Actuellement, il semble y avoir un consensus considérant que les patients atteints de MA ont simultanément une pathologie A $\beta$  et une pathologie tau néocorticale importante. Il existerait une synergie entre les deux processus neurodégénératifs (Bouras et al., 1993; Braak et Braak, 1991, 1997; Duyckaerts 2004). Il est important de noter que les patients non-déments peuvent aussi avoir des dépôts d'A $\beta$  modérés et une pathologie tau qui va jusqu'à la région temporale. Ces patients, affectés par les deux lésions fondamentales de la MA seraient à une phase infraclinique (ou prodromique) de la maladie pouvant débuter 20 ans avant l'établissement du diagnostic (phase 1, **Fig. 6**). Ce sont des patients qui présentent parfois de légers troubles de la mémoire (MCI pour "mild cognitive impairment" en anglais). L'évolution vers des lésions s'étendant au cortex occipital et frontal où la parole, la compréhension et le repérage dans l'espace sont affectés, constituerait la deuxième phase de l'évolution. On parle de MA au stade léger à modéré pouvant durer de 2 à 10 ans (phase 2, **Fig. 6**). Enfin, une phase 3 s'établirait, d'une durée de 1 à 5 ans, lorsque la totalité du cortex serait atteint par les lésions. Elle constituerait la phase d'atteinte sévère. Il s'en suivrait une perte de communication, de reconnaissance des proches allant jusqu'à la perte de l'autonomie du patient (phase 3, **Fig. 6**).



**Figure 6.** Schéma représentant l'évolution de la localisation des lésions dans la maladie d'Alzheimer. De gauche à droite, la phase infraclinique (1), la phase légère à modérée (2) puis la phase d'atteinte sévère (3).

## E. La thérapeutique

### 1. La thérapeutique actuelle

À l'heure actuelle, aucune thérapie n'est disponible pour arrêter la dégénérescence progressive de la MA. Il existe cependant des traitements qui tentent de ralentir le déclin cognitif et des traitements à visée psycho-comportementale.

Une perte sélective de neurones cholinergiques au niveau de l'hippocampe et du cortex frontal ([Arendt et al., 1985](#)) ainsi qu'une diminution drastique des taux de choline acétyltransférase ([Bowen et Davison, 1980](#); [Nagai et al., 1983](#); [Rossor et al., 1982](#)) ont apportés les bases physiopathologiques indiquant que le système cholinergique est impliqué dans le déficit cognitif des patients atteints de la MA. Afin d'augmenter la concentration en acétylcholine, trois stratégies ont été proposées: (i) l'apport de précurseur de l'acétylcholine (lécithine), (ii) l'inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation de l'acétylcholine (phytostigmine, tétrahydroaminoacridine, donépézil, rivastigmine, galantamine), (iii) la stimulation des récepteurs post-synaptiques par des agonistes muscariniques ou nicotiniques. L'inhibition de l'acétylcholinestérase est la seule approche qui a conduit à la mise sur le marché de médicaments. La tacrine, mise sur le marché en 1994, a été retirée du marché à cause de sa toxicité hépatique. Le donépézil (1997) et la rivastigmine (1998), puis la galantamine (2000) se sont révélés être modestement efficaces dans les formes légères et modérées de la maladie en ralentissant sa progression, en dépit de certains effets secondaires



(troubles digestifs, crampes, bradycardie) et de l'existence d'une population non négligeable de "non répondeurs".

Une autre classe thérapeutique ayant pour but de freiner le système glutamatergique est sur le marché. Suite à une diminution du relargage du glutamate, constaté dans la MA, le système glutamatergique réhausse son niveau d'activité synaptique basal par différents mécanismes (Francis, 2008). Cependant, cette hausse crée un "bruit de fond" qui perturbe la neurotransmission physiologique et qui peut devenir neurotoxique au-delà d'un certain niveau. La mémantine est un antagoniste non-compétitif à affinité modérée pour les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), réduisant l'entrée de calcium dans les neurones (Müller et al., 1995). Cette molécule a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2002 et a montré une efficacité dans les formes modérées à sévères de la MA. Elle est assez bien tolérée à ces stades malgré des effets indésirables signalés (vertige, céphalée et asthénie, plus rarement hallucinations et confusions).

Les traitements des manifestations psycho-comportementales sont rendus délicats car leurs effets, directs ou indirects, peuvent aggraver la symptomatologie cognitive et non cognitive de la MA. Néanmoins, un rapport de la Haute Autorité de Santé en 2007 constate que ces co-prescriptions sont fréquentes. Dans 30 à 40% des cas, les patients sous "anti-Alzheimer" ont également un antidépresseur, le plus souvent un inhibiteur de la recapture de la sérotonine. Et dans 10 à 20% des cas, ils prennent également un neuroleptique malgré une absence de consensus à ce sujet et des risques iatrogènes plus élevés. Compte tenu de la gravité de la MA et du possible rôle structurant du médicament dans la prise en charge globale de cette maladie, les instituts de santé ("<http://www.has-sante.fr>"; National Institute for Clinical Excellence, 2001) considèrent, malgré un rapport efficacité/effets indésirables modeste, que le service médical rendu par les "anti-Alzheimer" (anticholinestérasiques et mémantine) reste important. Enfin la prescription de médicaments n'est qu'un des éléments de la stratégie de prise en charge des patients. Dans le domaine cognitif, les ateliers mémoire, l'ergothérapie, l'art-thérapie et d'autres encore se révèlent être très utiles au patient. Ces thérapies complémentaires stimulent les capacités restantes du malade en vue d'améliorer sa qualité de vie et celle de son entourage.

## **2. La recherche thérapeutique**

### ***a. Eliminer les dépôts amyloïdes***

Au vue de la physiopathologie de la MA, une voie pharmacologique logique vise à éliminer les dépôts amyloïdes. Des études menées sur des modèles animaux de la MA (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000; Schenk et al., 1999) ont montré que la vaccination (injection du peptide amyloïde) protégerait contre le développement de dépôts amyloïdes (prévention) et permettrait également la diminution de ceux pré-existants (traitement). Compte tenu de ces résultats précliniques prometteurs, 375 patients aux Etats-Unis et en Europe ont été immunisés contre le peptide amyloïde avec production d'anticorps traversant la barrière hémato-encéphalique et éliminant ainsi les dépôts amyloïdes. Malheureusement, cette stratégie eu des effets délétères puisque 5 % des patients traités, ont développé dès la deuxième injection une méningo-encéphalite auto-immune conduisant à l'arrêt de l'essai clinique. Cependant, des examens autopsiques ont pu être réalisés chez des patients décédés depuis l'essai (Nicoll et al., 2003). Ils ont montré que la thérapeutique s'est avérée efficace sur la diminution de la charge en substance amyloïde dans le cerveau. D'autre part, le nombre d'injections prévues n'ayant pas été réalisé, il n'a pas été possible de juger de l'efficacité clinique de cette réduction de la charge amyloïde sur les fonctions cognitives. Toutefois, certains tests psychométriques se sont avérés meilleurs dans le groupe traité (Hock et al., 2003). De nouvelles stratégies, visant également à diminuer la charge amyloïde, sont en cours : l'immunisation passive par injection directe d'anticorps évitant la production non contrôlée d'anticorps par les patients eux-mêmes (Gardberg et al., 2007) et l'immunisation contre un fragment seulement des peptides amyloïdes (Maier et al., 2006).

Récemment, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) ont montré qu'ils provoquaient une forte baisse de l'incidence de la MA, notamment chez des sujets consommant de l'ibuprofène (Vlad et al., 2008). Ces AINS permettraient également une diminution de la concentration en oligomères d'A $\beta$  intraneuronaux chez des souris triple transgéniques (APP/PS/Tau) (Lim et al., 2000; McKee et al., 2008). Il reste à déterminer si un tel traitement préventif n'exposerait pas à trop d'effets indésirables.

L'administration intra-cérébro-ventriculaire (icv) de cannabinoïdes réduisant l'accumulation de plaques amyloïdes et l'inflammation dans un modèle de rat avec injection icv de peptide A $\beta$  25-35 ([Ramirez et al., 2005](#)) est également une piste à l'étude.

Ces stratégies décrites tentent d'éliminer un peptide qui s'est déjà déposé. Physiologiquement, le peptide amyloïde est présent chez chacun d'entre nous, en concentration plus ou moins importante. C'est cette concentration qui va déterminer un processus d'agrégation en plaque amyloïde ou non. Or, la régulation de cette concentration est dépendante de la synthèse et de la dégradation du peptide. Des équipes tentent de diminuer la synthèse en administrant des agents inhibiteurs des  $\gamma$ -sécrétases ([Chécler et al., 2005](#); [Evin et al., 2006](#)) ou des  $\beta$ -sécrétases ([Singer et al., 2005](#)). D'autres s'attèlent à stimuler une enzyme de dégradation du peptide amyloïde, la néprylisin ([Iwata et al., 2001](#); [Pardossi-Piquard et al., 2005](#); [Saito et al., 2005](#)). Toute la difficulté réside dans la régulation fine entre la dégradation et la synthèse des peptides amyloïdes.

### ***b. Réduire les dégénérescences neurofibrillaires***

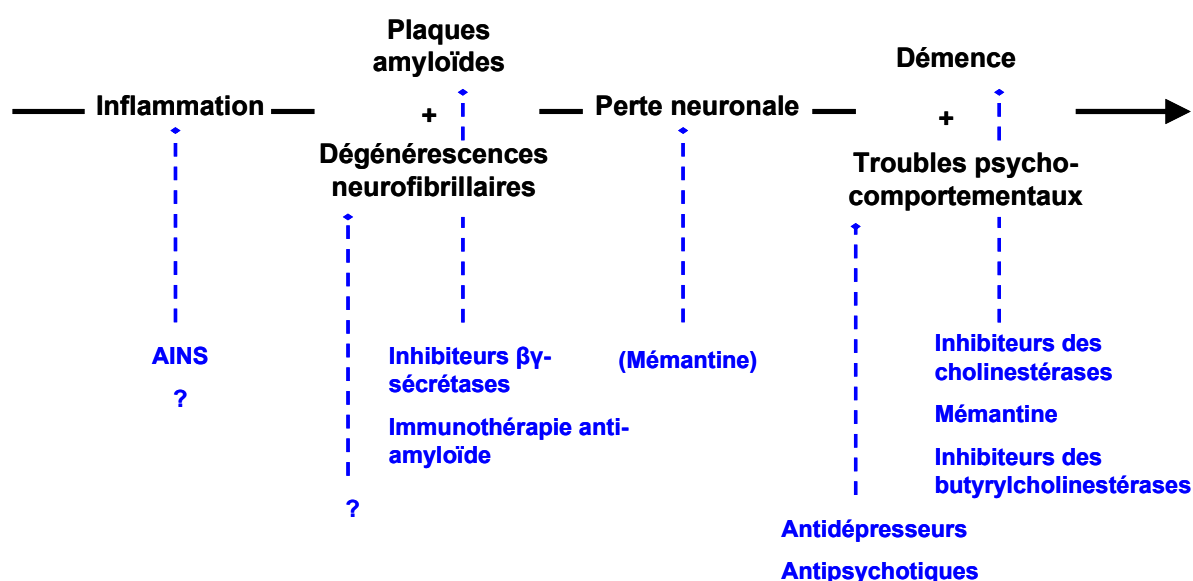
Une autre voie de recherche vise à réduire les dégénérescences neurofibrillaires composées de protéines tau hyperphosphorylées. Les stratégies visent donc à inhiber les kinases responsables de la phosphorylation accrue ou à stimuler les phosphatases déphosphorylantes ([Iqbal et al., 2003](#)). Récemment, une étude clinique de phase II a testé la toxicité et le dosage d'une molécule inhibant l'agrégation des protéines tau, chez 321 patients atteints de MA légère à modérée. Après 24 mois de traitement avec 60 mg de méthylthionium chloride (rember™), 3 fois par jour, les patients atteints d'une MA ont montré une réduction de 81% de leur taux de déclin cognitif, par rapport aux témoins ([Wischik et al., 2008](#)). Ces résultats sont très encourageants et des études de phase III sont attendus, pour tester l'efficacité sur un plus grand nombre de patients.

### ***c. Protéger les neurones***

La protection neuronale comporte deux objectifs: (i) freiner la mort des neurones et (ii) favoriser la survie. La mémantine actuellement utilisée en thérapeutique limiterait la mort des neurones en réduisant l'entrée de calcium à l'intérieur de ceux-ci. Les facteurs neurotrophiques ont, par définition, des propriétés stimulantes sur la croissance et la prolifération des neurones. Leur intérêt en thérapeutique ([Schindowski et al., 2008](#)) semble évident mais les

difficultés d'administration (injection icv) et leurs effets indésirables les rendent actuellement difficiles à manipuler.

Compte tenu de la multitude des cibles thérapeutiques envisagées (**Fig. 7**), l'association de traitements ayant des mécanismes d'action synergiques apparaît comme une solution cohérente. Assez récemment, une molécule inhibitrice de la butyrylcholinestérase (enzyme dégradant l'acétylcholine) est parvenue à cumuler des effets positifs en élevant le niveau d'acétylcholine, en améliorant l'apprentissage et en réduisant la charge amyloïde chez des souris double transgéniques (APP humain + PS1) ([Greig et al., 2005](#)).



**Figure 7.** Proposition de schéma des voies d'entrée thérapeutiques par rapport à l'évolution temporelle de la maladie d'Alzheimer.

## F. Le diagnostic

Malgré les résultats encore modestes des thérapeutiques précédemment décrites, il est admis que la précocité et la spécificité du diagnostic sont des facteurs cruciaux pour la prise en charge de la MA. Dans ce contexte, afin de réaliser un bon diagnostic différentiel, spécifique et sensible, il convient de ne pas méconnaître l'étendue étiologique des démences. Elles peuvent être d'origine dégénérative, non-dégénérative ou les deux.

Les démences dégénératives connues sont la MA, les démences frontotemporales, les démences à corps de Lewy, la dégénérescence corticobasale, la démence avec maladie de

Parkinson, la paralysie supranucléaire progressive, la maladie de Huntington, le syndrome de Down, et le syndrome de Gertsmann-Straussler-Scheinker.

Les démences non-dégénératives sont très nombreuses et peuvent être d'origine vasculaire (infarctus multiples, angiopathie amyloïde...), carencielle (vitamine B1, B12, PP...), métabolique et endocrinienne (dysthyroïdie, encéphalopathie hépatique...), infectieuse et inflammatoire (démence du SIDA, neuro-syphilis, maladie de Creutzfeld-Jakob, sclérose en plaques...), toxique (iatrogène, CCl<sub>4</sub>, alcoolisme chronique, syndrome Korsakoff...) ou encore mécanique (hydrocéphalie chronique de l'adulte...). Le diagnostic de démence dégénérative passe donc d'abord par l'élimination de ces multiples causes de syndrome dementiel.

## **1. Le diagnostic actuel**

Les standards diagnostiques qui prévalent sont ceux définis par le NINCDS-ADRDA (pour National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) ([McKhann et al., 1984](#)) et le DSM-IV ("[Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders](#)", 4<sup>ème</sup> édition, publié en 1994 par l'[Association Américaine de Psychiatrie](#) ou "[APA](#)" en anglais). Le diagnostic repose essentiellement sur l'examen clinique c'est-à-dire un interrogatoire complété par des tests neuropsychologiques, comportementaux et cliniques. Les signes cliniques associent des troubles de la mémoire (amnésie), à des troubles du langage (aphasie), de la motricité (apraxie) et de la reconnaissance des objets, des lieux et des sons (agnosie). Les troubles de la mémoire sont constants et s'associent de façon variable aux autres signes ce qui explique la grande variété des tableaux cliniques, même à une phase avancée de la maladie. Un recours aux tests neuropsychologiques (CDR pour Clinical Dementia Rating Scale, MMSE pour Mini Mental Status Examination) complétés par des tests de mémoire basés sur des grilles standardisées permettent une analyse de la mémoire par une approche qualitative et quantitative. Parmi les sujets consultants spontanément (ou par le biais de leur entourage) pour une plainte mnésique, 60% ont des résultats normaux aux tests, 20% ont des performances altérées par l'anxiété ou la dépression, et 20% ont une maladie organique correspondant le plus souvent à une maladie d'Alzheimer ([Croisile et Rothoft, 2004](#)).

Les examens complémentaires biologiques et d'imagerie ont pour rôle d'écarter d'autres origines démentielles. La ponction lombaire va permettre de doser les protéines A $\beta$  et tau dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Sunderland et al., 2006).

Les deux examens d'imagerie couramment pratiqués en consultation mémoire sont la scintigraphie cérébrale et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La scintigraphie cérébrale, au moyen de traceurs radioactifs (HMPAO pour hexa méthyl propylène amine oxyme ou ECD pour éthyl cystéinate dimère, tous deux marqués au  $^{99m}\text{Tc}$ ) injecté au patient, permet d'appréhender une diminution du débit sanguin cérébral régional rapporté à l'activité neuronale régionale (Farid et al., 2007). L'IRM est une imagerie anatomique non isotopique, qui permet de suivre l'atrophie hippocampique au cours du temps. Malgré la multiplicité des approches diagnostiques, aucune n'a encore permis d'atteindre 100% de spécificité.

## **2. Le concept de trouble cognitif léger (MCI)**

On sait actuellement que la MA est déjà bien évoluée avant qu'elle ne devienne symptomatique et qu'elle ne soit diagnostiquée. C'est dans ce contexte qu'a été défini le concept de MCI (Petersen et al., 1997, 1999). Il recouvre un état clinique correspondant aux sujets présentant un déficit mnésique objectif, mais chez lesquels on ne peut pas encore porter le diagnostic de MA. Sa définition repose sur un certain nombre de critères:

- La plainte mnésique est confirmée par l'interrogatoire du patient et de ses proches.
- Le fonctionnement cognitif est globalement normal.
- Il existe une préservation des activités de la vie quotidienne.
- Le déficit mnésique rapporté à l'âge et au niveau culturel est bien présent.
- Des critères de démence sont absents.

La caractérisation du MCI s'inscrit dans la perspective d'un continuum cognitif entre le vieillissement normal, le MCI puis la MA. L'intérêt de ce concept est d'attirer l'attention sur l'existence de troubles cognitifs pré-démentiels et de posséder une indéniable pertinence clinique. Cependant, le MCI apparaît comme un syndrome aux contours flous, regroupant des entités nosographiques variées qui peuvent, indépendamment de leur étiologie, partager des critères communs (Fisk et al., 2003; Ritchie et al., 2001). Cette diversité des situations

cliniques a conduit à une réécriture de ce concept. Trois sous-types ont ainsi été proposés (Gauthier et al., 2006; Petersen et al., 2004). (i) Le MCI "mnésique" avec une amnésie qui évolue préférentiellement vers la MA. (ii) Le MCI "domaines multiples" comportant une altération de plusieurs fonctions cognitives qui peut évoluer vers une MA, une démence vasculaire ou encore être une modalité de vieillissement normal. (iii) Le MCI "domaine unique non mnésique" qui décrit l'altération d'une fonction cognitive autre que la mémoire et dont l'évolution peut être étiologiquement multiple (dégénérescence fronto-temporale (DFT), démence vasculaire (DVa), démence à corps de lewy (DCL), MA). Le concept de MCI est donc pertinent et utile mais n'apporte pas les éléments convaincants et précis prédictifs d'une conversion vers une MA. L'identification d'une MA passe, comme nous l'avons vu, par une évaluation plus exhaustive neuropsychologique et de neuro-imagerie.

### **3. La mise à jour des critères diagnostiques**

Récemment, une équipe internationale d'experts, sous l'impulsion du Pr. Dubois (la Pitié Salpêtrière), a proposé de nouveaux critères permettant, au mieux, de détecter la maladie trois ans avant l'apparition des symptômes démentiels (Dubois et al., 2007). Le critère majeur reste la présence d'un trouble de la mémoire épisodique. A celui-ci s'ajoutent un ou plusieurs de ces nouveaux critères. Un critère biologique par la mise en évidence de biomarqueurs de la MA (protéine tau et A $\beta$ ) dans le liquide céphalo-rachidien (Blennow, 2004; Lewczuk et al., 2008) ou dans le sang (Jellinger et al., 2008). Un critère morphologique par la détection de l'atrophie de l'hippocampe par IRM (Baron et al., 2001; Chételat et al., 2005, 2008; Frisoni et al., 2007). Enfin, un critère fonctionnel par l'observation de la diminution de l'activité cérébrale dans les régions temporales ou pariétales par imagerie Tomographique par Emission de Positons (TEP) (Mosconi, 2005; Mosconi et al., 2008).

### **4. Le diagnostic de certitude *post-mortem***

Le diagnostic de certitude repose sur les données de l'examen anatomo-pathologique du cerveau qui met en évidence la présence de plaques amyloïdes extracellulaires et de dégénérescences neurofibrillaires intraneuronales (Mudher et Lovestone, 2002). Cet examen anatomique n'est évidemment réalisé qu'en *post-mortem* et ne présente donc pas de bénéfice direct pour le patient.

Les difficultés de diagnostic rencontrées à l'heure actuelle, notamment pour prédire la conversion des MCI mnésiques vers la MA renforcent l'intérêt de développer, entre autres, les méthodologies de l'imagerie TEP.



# Bibliographie

1. Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, Arendt A (1985). Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 14:1-14.
2. Baron JC, Chételat G, Desgranges B, Perchey G, Landeau B, de la Sayette V, Eustache F (2001). *In vivo* mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 14:298-309.
3. Blennow K (2004). Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1(2):213-25.
4. Bouras C, Hof PR, Morrison JH (1993). Neurofibrillary tangle densities in the hippocampal formation in a non-demented population define subgroups of patients with differential early pathologic changes. *Neurosci Lett* 153:131-5.
5. Bowen DM, Davison AN (1980). Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia. *Psychol Med* 10:315-9.
6. Braak H, Braak E (1991). Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia. *J Hirnforsch* 32:277-82.
7. Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87:554-567.
8. Braak H, Braak E (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18:351-7.
9. Chapman PF, Falinska AM, Knevetz SG, Ramsay MF (2001). Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends Genet* 17:254-61.
10. Chécler F, Alves da Costa C, Ayrat E, Andrau D, Dumanchin C, Farzan M, Hernandez JF, Martinez J, Lefranc-Jullien S, Marambaud P, Pasini A, Petit A, Phiel C, Robert P, St George-Hyslop P, Wilk S (2005). J1K inhibitors: isocoumarin compounds as putative probes to selectively target the gamma-secretase pathway. *Curr Alzheimer Res* 2:327-34.
11. Chételat G, Landeau B, Eustache F, Mézenge F, Viader F, de la Sayette V, Desgranges B, Baron JC (2005). Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *Neuroimage* 27:934-46.
12. Chételat G, Desgranges B, Landeau B, Mézenge F, Poline JB, de la Sayette V, Viader F, Eustache F, Baron JC (2008). Direct voxel-based comparison between grey matter hypometabolism and atrophy in Alzheimer's disease. *Brain* 131(Pt 1):60-71.
13. Croisile B, Rothoft JM (2004). Plaintes de mémoire en médecine de ville: présentation et prise en charge. *La Revue de gériatrie* 29:178-188.
14. Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, Pasquier F, David JP (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59:398-407.
15. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158-65.

16. Dodart JC, Mathis C, Ungerer A (1999). Des formes sécrétées du précurseur de la protéine  $\beta$ -amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer améliorent la mémoire des souris. *Médecine/sciences* 15:246-8.
17. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-46.
18. Duyckaerts C (2004). Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiol Aging* 25:735-739.
19. Echeverria V, Ducatenzeiler A, Dowd E, Jänne J, Grant SM, Szyf M, Wandosell F, Avila J, Grimm H, Dunnett SB, Hartmann T, Alhonen L, Cuello AC (2004). Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience* 129:583-92.
20. Evin G, Sernee MF, Masters CL (2006). Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies. *CNS Drug* 20:351-72.
21. Farid K, Habert MO, Perdrisot R (2007). Scintigraphie cérébrale de perfusion et exploration des syndromes démentiels: illustration à l'aide de cinq cas cliniques. *Médecine Nucléaire* 31:36-47.
22. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodarty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M; Alzheimer's disease International (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-7.
23. Fisk JD, Merry HR, Rockwood K (2003). Variations in case definition affect prevalence but not outcomes of mild cognitive impairment. *Neurology* 61:1179-84.
24. Francis PT (2008). Glutamatergic approaches to the treatment of cognitive and behavioural symptoms of alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 5:241-3.
25. Frisoni GB, Pievani M, Testa C, Sabattoli F, Bresciani L, Bonetti M, Beltramello A, Hayashi KM, Toga AW, Thompson PM (2007). The topography of grey matter involvement in early and late onset Alzheimer's disease. *Brain* 130(Pt 3):720-30.
26. Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y (2007). Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Curr Top Med Chem* 7:1773-89.
27. Gardberg AS, Dice LT, Ou S, Rich RL, Helmbrecht E, Ko J, Wetzel R, Myszkowski DG, Patterson PH, Dealwis C (2007). Molecular basis for passive immunotherapy of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15659-64.
28. Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B; International Psychogeriatric Association Expert Conference on mild cognitive impairment (2006). Mild cognitive impairment. *Lancet* 367:1262-70.
29. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-6.
30. Goedert M, Klug A, Crowther RA (2006). Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9(3 Suppl):195-207.
31. Gray EG, Paula-Barbosa M, Roher A (1987). Alzheimer's disease: paired helical filaments and cytomembranes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 13:91-110.

32. Greig NH, Utsuki T, Ingram DK, Wang Y, Pepeu G, Scali C, Yu QS, Mameczarz J, Holloway HW, Giordano T, Chen D, Furukawa K, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer beta-amyloid peptide in rodent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17213-8.
33. Hardy JA, Allsop D (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
34. Hardy JA, Higgins CA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-186.
35. Hardy JA (1992). An "anatomical cascade hypothesis" for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 15:200-201.
36. Hock C, Konietzko U, Streffer JR, Tracy J, Signorell A, Müller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann M, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron* 38:547-54.
37. Husby G, Natvig JB, Michaelsen TE, Sletten K, Host H (1973). Unique amyloid protein subunit common to different types of amyloid fibril. *Nature* 244:362-4.
38. Iqbal K, Alonso Adel C, El-Akkad E, Gong CX, Haque N, Khatoon S, Pei JJ, Tanimukai H, Tsujio I, Wang JZ, Grundke-Iqba I (2003). Alzheimer neurofibrillary degeneration: therapeutic targets and high-throughput assays. *J Mol Neurosci* 20:425-9.
39. Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24:751-762.
40. Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM (2001). Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* 158:555-562.
41. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001). Metabolic regulation of brain Aβ by neprilysin. *Science* 292:1550-2.
42. Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-82.
43. Jayadev S, Steinbart EJ, Chi YY, Kukull WA, Schellenberg GD, Bird TD (2008). Conjugal Alzheimer disease: risk in children when both parents have Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65:373-8.
44. Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E (2008). Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: "ALZheimer ASSociated gene"- a new blood biomarker? *J Cell Mol Med* (sous presse).
45. Johnson GV, Stoothoff WH (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117(Pt 24):5721-9.
46. Lahiri DK (2004). Apolipoprotein E as a target for developing new therapeutics for Alzheimer's disease based on studies from protein, RNA, and regulatory region of the gene. *J Mol Neurosci* 23:225-33.
47. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ<sub>1-42</sub> are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-53.

48. Lawlor BA (2004). Behavioral and psychological symptoms in dementia: the role of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 65 (Suppl.11):5-10.
49. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269:973-7.
50. Lewczuk P, Kamrowski-Kruck H, Peters O, Heuser I, Jessen F, Popp J, Bürger K et al., (2008). Soluble amyloid precursor proteins in the cerebrospinal fluid as novel potential biomarkers of Alzheimer's disease: a multicenter study. *Mol Psychiatry* (sous presse, consultable en ligne).
51. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Exkman D, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.
52. Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 20:5709-14.
53. Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hébert R, Helliwell B, Hill GB, McDowell I (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 156:445-53.
54. Lovestone S, Reynolds CH (1997). The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopmental and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78:309-324.
55. Lyness SA, Zarow C, Chui HC (2003). Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Neurobiol Aging* 24:1-23.
56. Maier M, Seabrook TJ, Lazo ND, Jiang L, Das P, Janus C, Lemere CA (2006). Short amyloid-beta (Aβ) immunogens reduce cerebral Aβ load and learning deficits in an Alzheimer's disease mouse model in the absence of an Aβ-specific cellular immune response. *J Neurosci* 26:4717-28.
57. McKee AC, Carreras I, Hossain L, Ryu H, Klein WL, Oddo S, Laferla FM, Jenkins BG, Kowall NW, Dedeoglu A (2008). Ibuprofen reduces Aβ, hyperphosphorylated tau and memory deficits in Alzheimer mice. *Brain Res* 1207:225-36.
58. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-44.
59. Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 91:633-641.
60. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-5.
61. Mosconi L (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:486-510.
62. Mosconi L, De Santi S, Brys M, Tsui WH, Pirraglia E, Glodzik-Sobanska L, Rich KE, Switalski R, Mehta PD, Pratico D, Zinkowski R, Blennow K, de Leon MJ (2008). Hypometabolism and altered cerebrospinal fluid markers in normal apolipoprotein E E4 carriers with subjective memory complaints. *Biol Psychiatry* 63:609-18.
63. Mudher A, Lovestone S (2002). Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends Neurosci* 25:22-6.

64. Müller WE, Mutschler E, Riederer P (1995). Noncompetitive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency as potential therapeutic agents for Alzheimer's dementia. *Pharmacopsychiatry* 28:113-24.
65. Nagai T, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG, Dolman CE (1983). Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. *Neurosci Lett* 36:195-9.
66. National Institute for Clinical Excellence (NICE). Guidance on the use of donepezil, rivastigmine and galantamine for the treatment of Alzheimer's disease. London, 2001.
67. Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448-52.
68. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Müller U, St George Hyslop P, Chécler F (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541-54.
69. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangalos EG (1997). Aging, memory, and mild cognitive impairment. *Int Psychogeriatr* 9:65-9.
70. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-8.
71. Petersen RC (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256:183-94.
72. Pinder RM, Sandler M (2004). Alcohol, wine and mental health: focus on dementia and stroke. *J Psychopharmacol* 18:449-56.
73. Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904-13.
74. Ritchie K, Artero S, Touchon J (2001). Classification criteria for mild cognitive impairment: a population-based validation study. *Neurology* 56:37-42.
75. Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL (1982). A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain* 105(Pt. 2):313-30.
76. Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005). Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434-9.
77. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholokendo D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Woquilis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-7.
78. Schindowski K, Belarbi K, Buée L (2008). Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7(Suppl. 1):43-56.
79. Selkoe DJ (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399(6738 Suppl.):A23-31.
80. Selkoe DJ (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev* 81:741-66.
81. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-60.

82. Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2005). Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 8:1343-9.
83. Sunderland T, Hampel H, Takeda M, Putnam KT, Cohen RM (2006). Biomarkers in the diagnosis of Alzheimer's disease: are we ready? *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19:172-9.
84. Takahashi RH, Almeida CG, Kearney PF, Yu F, Lin MT, Milner TA, Gouras GK (2004). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci* 24:3592-9.
85. Tanzi RE, Bertram L (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120:545-55.
86. Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, Laferla FM (2007). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging* (sous presse).
87. Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70:1672-7.
88. Wischik CM et al, (2008). Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. ICAD 2008; Abstract 03-04-07.



# Chapitre 2 - Du radiotraceur à l'imagerie TEP des plaques amyloïdes

## I. Rappels bibliographiques

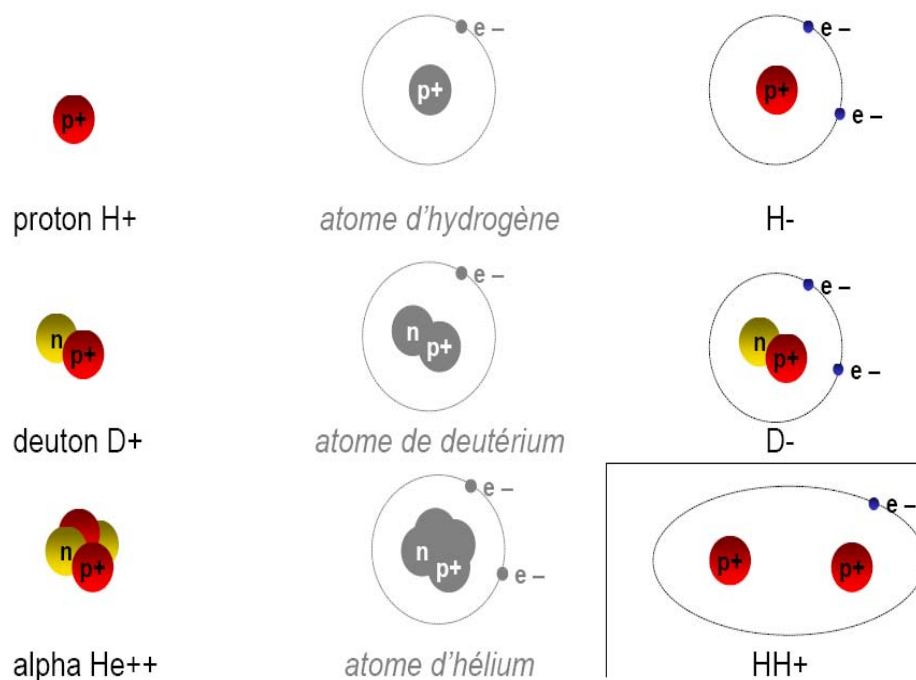
### A. Principe de l'imagerie TEP

La Tomographie par Emissions de Positons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire fonctionnelle qui, au moyen de radiopharmaceutiques marqués par des émetteurs de positons, permet de visualiser les processus physiologiques ou pathologiques *in vivo* de manière non-invasive ([Wang et Maurer, 2005](#)). Cette technique nécessite l'injection au sujet d'un vecteur moléculaire préalablement marqué avec un noyau atomique radioactif émetteur de positons (radiotraceur ou radioligand), ayant la capacité de fixer des récepteurs, des enzymes ou d'autres cibles moléculaires d'intérêt. C'est une technique possédant une excellente sensibilité, capable de détecter des cibles moléculaires présentes à des concentrations de l'ordre du picomolaire dans le corps humain ([Jacobs et Cherry, 2001](#); [Silverman et Phelps, 2001](#)).

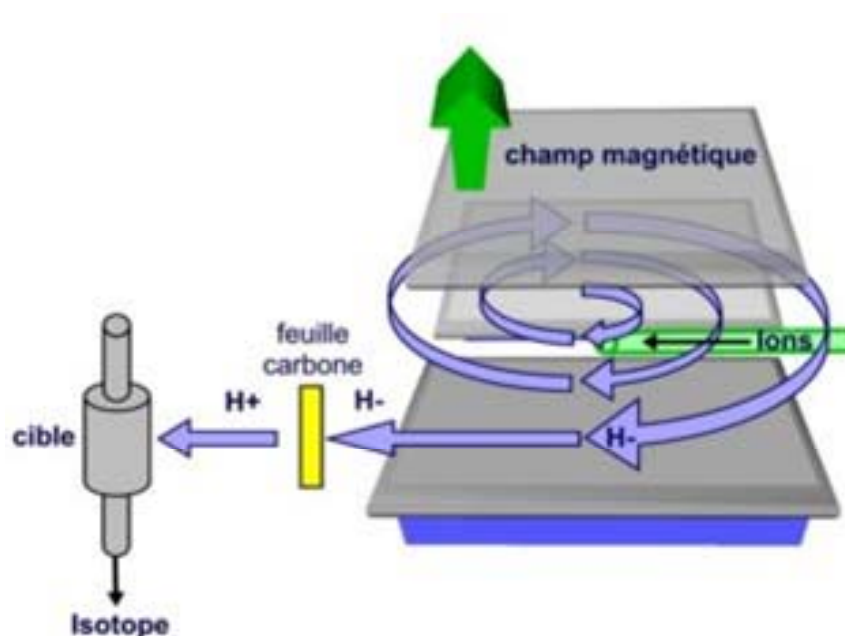
#### 1. La production des radiotraceurs TEP

La chaîne de radiosynthèse débute par la production des isotopes émetteurs de positons à demi-vie courte par un cyclotron installé sur site. Le cyclotron (**Fig. 9**) est un accélérateur de particules (**Fig. 8**) qui utilise un champ magnétique (circulariser la trajectoire), un champ électrique (accélérer) et une radiofréquence (synchroniser les accélérations) pour produire des faisceaux de protons et de deutons à des énergies de 18 et 39 MeV (très inférieures aux énergies de la physique nucléaire).



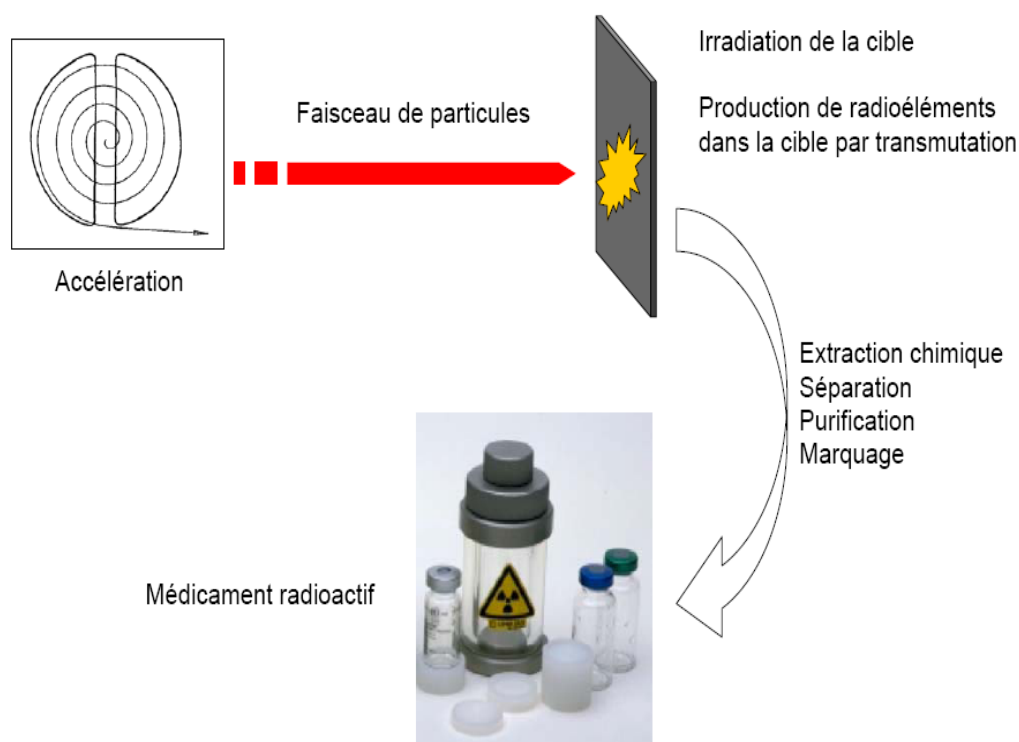


**Figure 8.** Représentation schématique des particules pouvant être accélérées par un cyclotron. L'atome est constitué d'un noyau de protons (charge positive) et de neutrons autour duquel gravitent des électrons (charge négative). L'atome a une charge électrique nulle.



**Figure 9.** Principe de fonctionnement du cyclotron. Les particules  $H$  sont accélérées dans un champ électrique et leur trajectoire est courbée par un champ magnétique. Une feuille de carbone retient les électrons excédentaires pour donner un faisceau de proton, qui va irradier la cible et produire des isotopes.

Le bombardement de noyaux ciblés par les particules accélérées va créer des isotopes excédentaires en protons, isotopes émetteurs de positons à très courte période. Le cyclotron du CERMEP (IBA 18/9 Cyclone; Ion Beam Application, Louvain-la-Neuve, Belgique) produit 4 isotopes,  $^{15}\text{O}$  (période demi-vie= 2,1 min),  $^{13}\text{N}$  (demi-vie = 10 min),  $^{11}\text{C}$  (demi-vie = 20,4 min) et  $^{18}\text{F}$  (demi-vie = 109,8 min).



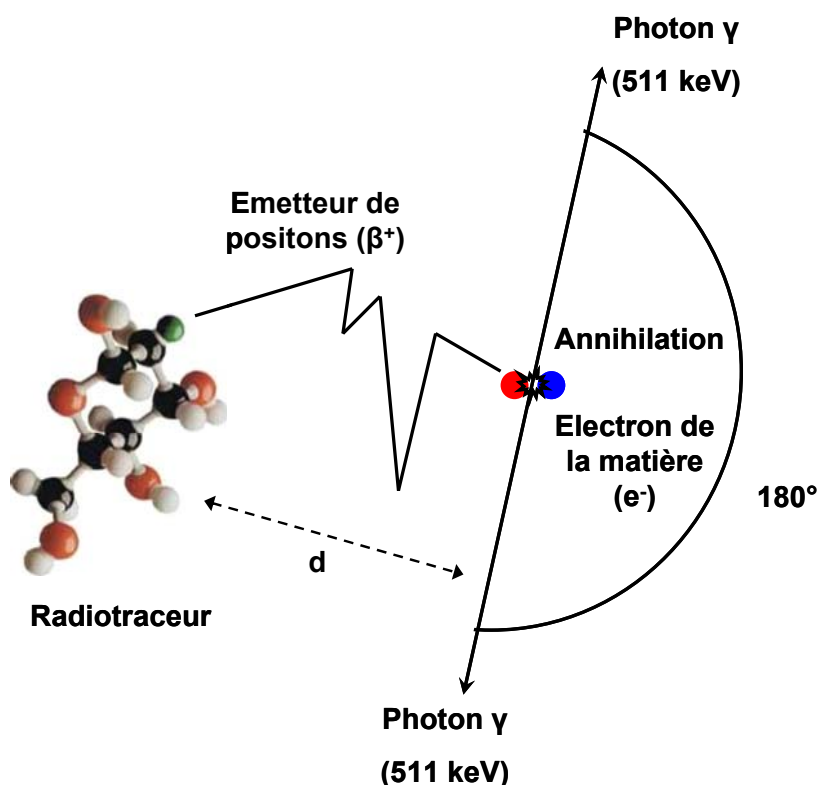
**Figure 10.** Principe de production des radiotraceurs du cyclotron jusqu'au médicament radioactif.

Le radioélément ainsi produit est incorporé dans une molécule précurseur par une réaction de radiochimie en cellule blindée pour donner le radioligand (ou radiotraceur). Dans la mesure du possible, les synthèses sont réalisées par des automates permettant de limiter l'intervention humaine et d'assurer la reproductibilité de la pureté et du rendement de la radiosynthèse. Le radiotraceur passe ensuite par une étape de purification, le plus souvent par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur des colonnes semi-préparatives C18 avec un détecteur UV et un détecteur de radioactivité afin de le séparer de la molécule précurseur initialement introduite en très large excès et des sous produits de la réaction. Le radiotraceur, en solution dans le solvant organique HPLC, est formulé pour le rendre injectable à l'animal ou à l'homme (**Fig. 10**). Les radiotraceurs injectables à l'homme ont le statut d'un médicament, leur formulation suit donc les règles strictes (Bonnes Pratiques de Fabrication) de l'industrie

pharmaceutique dans un environnement contrôlé de type salle blanche. La formulation se fait par passage de la solution sur une cartouche d'extraction phase solide type C18. Après un lavage à l'eau pour éliminer les solvants, le radioligand est récupéré en solution dans de l'éthanol et du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Le contrôle qualité du radioligand formulé se fait par HPLC analytique et permet de vérifier sa pureté. La stérilisation est ensuite réalisée par filtration sur membrane stérilisante (0,22  $\mu\text{m}$ ). Le radioligand dont la qualité radiopharmaceutique a été validée est ensuite injecté à l'animal ou au patient et l'examen peut être réalisé.

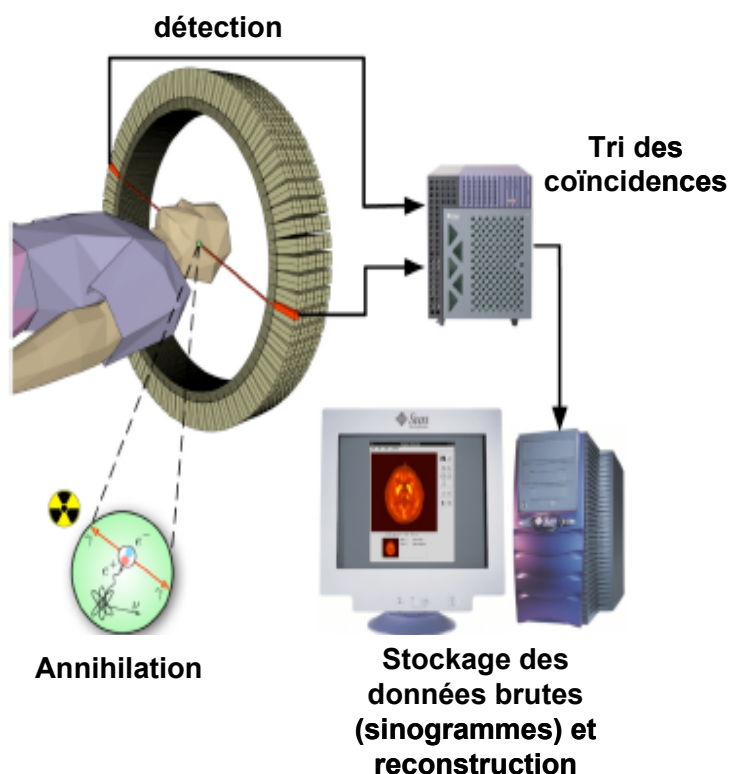
## 2. Le principe de détection

Le principe fondamental de la TEP est d'utiliser des atomes émetteurs de positons liés à des molécules organiques comme traceurs d'une activité physiologique endogène. Les émetteurs de positons sont caractérisés par un excès de charges positives dans leurs noyaux. Ils se désintègrent vers un état stable, par une transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un neutrino ( $n$ ) et d'un positon ( $\beta^+$ ). Celui-ci est de masse égale à celle d'un électron mais de charge opposée. Du fait de l'énergie libérée par la transition électronique, lors de son émission, le positon a la capacité de parcourir quelques millimètres dans les tissus (1 à 2 mm dans l'eau, constituant principal des tissus biologiques), au cours desquels il dissipe presque toute son énergie cinétique. La perte énergétique se poursuit jusqu'à ce que le positon interagisse avec un électron du milieu, suivant une réaction d'annihilation au cours de laquelle la masse des deux particules se transforme en deux photons gamma de 511 keV, émis dans des directions opposés (**Fig. 11**). La détection de ces deux photons en coïncidence permet donc de définir un axe virtuel sur lequel le positon s'est annihilé avec un électron du milieu, à quelques millimètres du lieu d'émission. Cette distance entre le lieu de l'émission et celui de l'annihilation, constitue une limite intrinsèque de la technique (**Fig. 11**, d).



**Figure 11.** Schéma représentant un radiotracer émettant un positon, le parcours du positon dans la matière ( $d$ ), l'annihilation avec un électron et l'émission de 2 photons de 511 keV à 180°.

La détection simultanée de deux photons gamma de 511 keV par le tomographe suppose qu'une désintégration a eu lieu sur la ligne joignant les deux points de détection (ligne de réponse). Le tomographe est constitué de couronnes de modules de détection qui enregistrent les photons, déterminent leur énergie, leur position dans le module et leur temps d'arrivée (**Fig. 12**). Ensuite, des circuits électroniques comparent les temps d'arrivées des photons sur des modules de détecteurs en regard dans la caméra. Lorsque deux photons ont des temps d'arrivée suffisamment proches (entre 4 et 12 ns), ils sont supposés provenir de la même annihilation et un évènement en coïncidence est enregistré. Les modules de détection sont composés d'un bloc de cristal scintillant inorganique, découpé en détecteurs élémentaires et couplé à des photomultiplicateurs. Le cristal converti le rayonnement gamma en un rayonnement lumineux moins énergétique. Les photomultiplicateurs recueillent l'énergie lumineuse et la transforment en un signal électrique pouvant être analysé ([Thèse de Nicolas Costes n°158-2007](#)).



**Figure 12.** Schéma du principe d'acquisition TEP: l'injection du traceur radioactif dans le corps, la détection des coïncidences de rayonnements  $\gamma$ , la correction des données brutes et la reconstruction tomographique.

## B. Les radiotraceurs TEP des plaques amyloïdes

Nous avons vu précédemment les difficultés de diagnostic de la MA. Il n'existe pas encore de marqueurs biologiques spécifiques et le diagnostic de certitude est uniquement *post-mortem*. Sachant que la présence de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires témoigne d'une MA, il est primordial de développer des radiotraceurs pouvant fixer ces cibles moléculaires, véritables signatures de la MA, et ce, de manière spécifique.

### 1. Les plaques amyloïdes comme cible moléculaire

Une cible majoritairement envisagée ces dernières années est l'accumulation de protéine A $\beta$ . De nombreux traceurs ont été développés pour les visualiser *in vivo*.

Pour développer des traceurs spécifiques d'une cible moléculaire, il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance de celle-ci. Nous avons vu que la voie amyloïdogénique de clivage d'APP impliquant les  $\beta$  et  $\gamma$ -sécrétases ([Selkoe, 2000](#)), produisait des peptides A $\beta$  de différentes longueurs (A $\beta$  (1-40), A $\beta$  (1-42), A $\beta$  (1-43)). Chacun possède des capacités propres d'agrégation en fonction de différents paramètres (concentration, pH, solvant, environnement). Ces enchaînements d'une quarantaine d'acides aminés forment des liaisons hydrogènes d'une distance avoisinant les  $5.10^{-10}$  m soit quelques Angströms (**Fig. 5**). Ils sont extrêmement insolubles (hydrophobes) et, dans un solvant aqueux, à pH modéré ou élevé, ils forment une structure en feuillets  $\beta$ -plissés d'une dizaine d'Angström. Le niveau structural supérieur est constitué par les protofilaments (environ  $30.10^{-10}$  m), puis les fibrilles (environ  $70.10^{-10}$  m) ([Serpell, 2000](#)). Enfin, des milliers de fibrilles forment une plaque sénile d'un diamètre de 60  $\mu$ m en moyenne, dans du tissu cérébral de patients décédés de la MA ([Bacskaï et al., 2002](#)). La résolution spatiale de l'imagerie TEP chez l'homme avoisinant 4,5 - 5 mm et 1,5 - 2 mm pour la microTEP chez le petit animal, le but de la TEP n'est donc pas de détecter une plaque sénile individuelle, mais plutôt d'avoir une mesure quantitative de la charge amyloïde moyenne dans les différentes régions cérébrales.

## 2. Les critères pour un radiotracer TEP cérébral

Les radiotraceurs TEP cérébraux doivent répondre à un certain nombre de critères ([Mason et Mathis, 2003](#)):

- Le radiomarquage par un émetteur de positons doit être chimiquement possible, et avec le moins d'étapes chimiques
- Le marquage doit être chimiquement stable (résistance aux réactions chimiques et biochimiques, au moins pendant 2 heures)
- Le marquage ne doit pas modifier le site actif de la molécule (permettant la liaison à la cible)
- La molécule marquée doit passer la barrière hémato-encéphalique ou BHE (molécule de petit poids moléculaire <400-600 Da, modérément lipophile)
- La toxicité de la molécule doit être très faible, malgré le fait qu'elle sera injectée à "dose traceuse"

- La cinétique de dégradation ne doit pas être trop rapide
- Les éventuels métabolites radioactifs ne doivent pas (ou peu) passer la BHE
- Le traceur doit présenter une affinité suffisante pour son récepteur (bonne affinité)
- Le traceur doit présenter de faibles liaisons non-spécifiques (bonne spécificité)

L'affinité du radiotraceur pour la cible dépend de la concentration de la cible dans l'organe étudié. Dans le cerveau de patients atteints de la MA, les concentrations de peptides A $\beta$  sont de l'ordre de 1 - 10  $\mu$ M ([Ingelsson et al., 2004](#)), c'est-à-dire bien supérieures (1000 fois) à celles des récepteurs ou transporteurs cérébraux par exemple (de l'ordre du nanomolaire). L'affinité théorique ( $K_d$ , constante de dissociation à l'équilibre) d'un radiotraceur pour sa cible amyloïde a été établie à 20 nM ([Mathis et al., 2003](#)), ce qui est supérieur aux valeurs de l'ordre du pico ou nanomolaire, typiquement recherchées, pour les récepteurs cérébraux. La caractérisation de l'affinité d'un candidat est réalisée par des expériences *in vitro* de liaisons à des fibrilles A $\beta$  synthétiques. Un indicateur de cette valeur souvent utilisé est le  $K_i$  (constante d'inhibition) qui teste les capacités d'une ou plusieurs molécules candidates froides à inhiber la fixation d'un standard radioactif sur des fibrilles synthétiques par exemple.

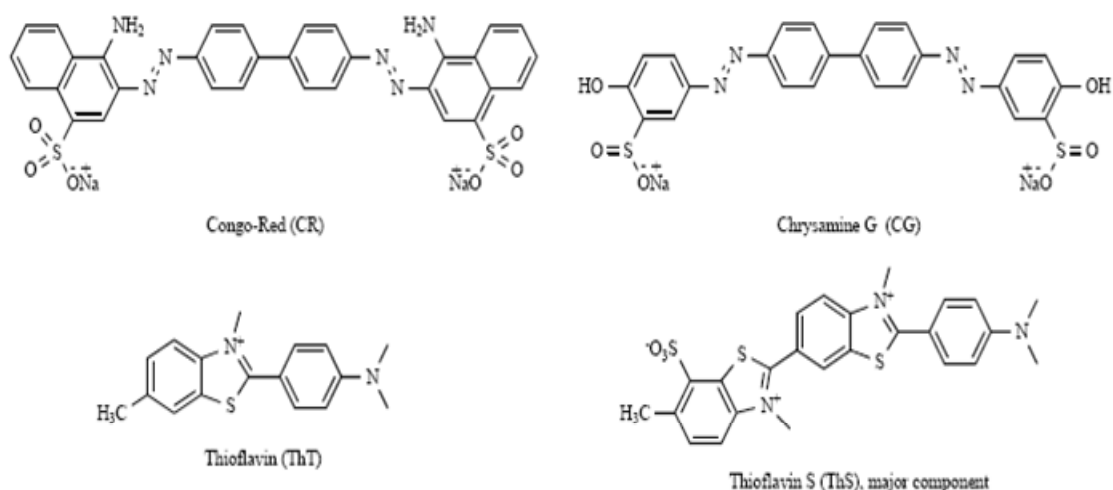
Le passage de la barrière-hémato-encéphalique (BHE) par diffusion passive dépend de la taille, du poids moléculaire et de la lipophilie du radiotraceur. Un bon radiotraceur cérébral aura une petite taille et un poids moléculaire de 400-600 Daltons ([Pardridge, 2005](#)). Sa lipophilie doit être suffisante pour passer la BHE (elle-même lipophile) mais, malgré tout, limitée, afin de ne pas se lier aux protéines plasmatiques ou à toute autre structure hydrophobe non-spécifique. Pour cela, le calcul du Log P de la molécule (coefficient de partition dans un mélange octanol-eau et/ou par logiciel informatique), permet d'évaluer son caractère lipophile. Un Log P compris entre 2 et 3 est approprié ([Eckelman et Mathis, 2006](#); [Vera et Eckelman, 2001](#); [Waterhouse, 2003](#)).

Enfin, du fait de la demi-vie courte des émetteurs de positons (demi-vie du  $^{11}\text{C}$  = 20,4 min;  $^{18}\text{F}$  = 109,8 min), la pharmacocinétique doit être adaptée. Ainsi, le passage cérébral du radiotraceur doit être rapide pour atteindre son maximum de fixation spécifique au moment où la composante non-spécifique commence à être évacuée du cerveau selon une cinétique supérieure ou égale à la période de décroissance du radioélément utilisé ([Mathis et al., 2004](#)).

L'optimisation de ces critères se fait dans le but d'obtenir des images interprétables, quantifiables, avec un rapport signal spécifique/signal non-spécifique le plus élevé possible.

### 3. Les molécules candidates

Le parcours d'une molécule traceuse candidate, depuis son choix lié à sa structure chimique jusqu'à son application en imagerie TEP chez l'homme, se subdivise en de multiples étapes limitantes. La molécule candidate de faible poids moléculaire et de lipophilie modérée va être testée pour son affinité *in vitro* envers des fibrilles synthétiques de peptides A $\beta$ . Des expériences d'autoradiographies *in vitro*, avec une version radiomarkée émettrice de positons, sont réalisées sur tissu cérébral *post-mortem* de patients Alzheimer et/ou sur des coupes de cerveaux de souris transgéniques, modèles de la pathologie. Puis des expériences de biodistribution chez le petit animal sont effectuées avant de pouvoir passer aux études d'imagerie chez les modèles animaux puis chez l'homme. En ce qui concerne les plaques amyloïdes, le choix s'est d'abord porté sur des composés organiques marqueurs d'amyloïdose utilisés en histologie ou anatomo-pathologie comme le Rouge Congo ("congo red" en anglais) et la Thioflavine T et S (**Fig. 13**). Ces marqueurs histologiques ont la capacité de lier la structure stéréochimique hydrophobe constituée par les feuillets  $\beta$ -plissés ([Makin et Serpell, 2002](#)).



**Figure 13.** Composés organiques marqueurs d'amyloïdose utilisés en histologie ou anatomo-pathologie (d'après [Furumoto et al., 2007](#)).



### **a. Les dérivés du rouge congo**

Le rouge congo est un colorant classiquement utilisé en neuroanatomo-pathologie dans les colorations des plaques amyloïdes. Du fait de sa faible lipophilie ( $\text{Log } P = -0,18$ ), l'intérêt s'est porté sur un analogue lipophile, la chrysamine G (**Fig. 13**). Marqué au carbone 14, il a montré une bonne affinité pour des fibrilles synthétiques *in vitro* ( $K_i = 2,7 \text{ nM}$ ) ainsi que pour des homogénats de cerveau de patients Alzheimer, mais sa pénétration cérébrale chez des souris était trop faible (Klunk et al., 1995, 1998; Mathis et al., 2004). Méthoxy-X04, un autre dérivé de la chrysamine G, possédait un faible poids moléculaire (344 Da), une lipophilie modérée ( $\text{Log } P = 2,6$ ) et une liaison sélective sur du tissu cérébral de patients Alzheimer et de souris transgéniques PS1/APP (Klunk et al., 2002), mais sa capacité à passer la BHE était insuffisante pour envisager son utilisation en imagerie TEP. Une série de dérivés de la chrysamine G, les styrylbenzènes ont pu être testés mais leur perméabilité au travers de la BHE était également trop faible (Kumar et al., 2005; Skovronsky et al., 2000; Zhuang et al., 2001).

### **b. Les dérivés des thioflavines**

La thioflavine S (ThS) (**Fig. 13**) est également utilisée pour le marquage histologique *in vitro* des plaques. La thioflavine T (ThT) (**Fig. 13**) possède un poids moléculaire plus faible que la ThS (LeVine, 1993). Cependant, elle porte une charge positive qui réduit fortement ses capacités de passage de la BHE. Des dérivés neutres de la ThT ont donc été développés et leur affinité, leur lipophilie et leur pharmacocinétique ont été étudiées (Mathis et al., 2003). Le composé numéro 20 (appelé PIB pour "Pittsburgh compound B") a démontré une bonne cinétique cérébrale d'entrée et surtout une évacuation rapide du cerveau chez des souris et des singes (rapport 30 min / 2 min = 11,6). L'affinité (inversement proportionnelle à la constante de dissociation  $K_d$ ) du PIB pour des homogénats de cerveau de patients décédés de la MA a été mesurée. Un site à haute affinité a pu être mis en évidence ( $K_d = 2,5 \text{ nM}$ ), ainsi qu'un site à basse affinité ( $K_d = 250 \text{ nM}$ ) (Klunk et al., 2003, 2005).

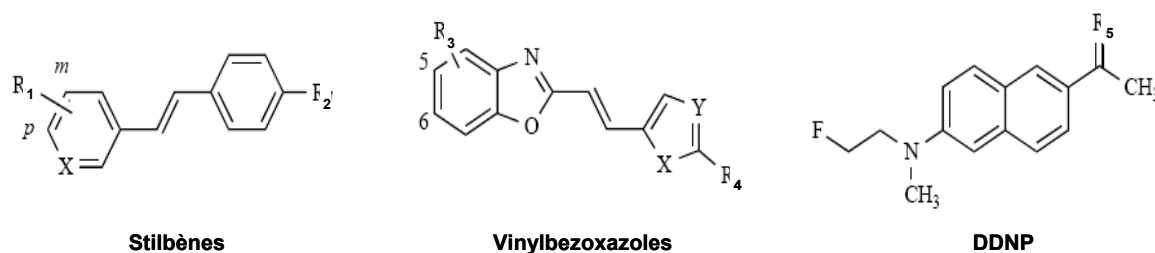
Indépendamment, d'autres dérivés neutres de la ThT ont été développés pour l'imagerie TEMP pour Tomographie par Emission Monophotonique (ou SPECT pour single photon emission computed tomography en anglais) des plaques amyloïdes (Zhuang et al., 2001). Cette imagerie utilise une  $\gamma$ -caméra qui va détecter des radiotraceurs émetteurs de

photons  $\gamma$  comme le  $^{99m}\text{Tc}$  (période = 6,03 heures; énergie du rayonnement  $\gamma$  = 140 keV) ou  $^{123}\text{I}$  (période = 13 heures; énergie du rayonnement  $\gamma$  = 159 keV). Le IMPY, marqué à l'iode 123, a démontré des propriétés adéquates pour devenir un bon radiotraceur des plaques amyloïdes (Kung et al., 2002, 2004b; Newberg et al., 2006; Zhuang et al., 2003).

Des analogues du IMPY ont été marqués au fluor 18, pour des études menées en TEP. Les études menées chez des souris et des macaques rhésus ont montré des pharmacocinétiques correctes mais des améliorations étaient nécessaires afin de réduire les métabolites radioactifs, et afin d'atteindre une meilleure affinité (Cai et al., 2004; Zeng et al., 2006). Récemment, un dérivé du IMPY a été marqué au carbone 11 et testé chez le petit animal (souris, rat) et le macaque rhésus. Malgré de bonnes caractéristiques d'affinité et de pharmacocinétique, la métabolisation *in vivo* du composé limite son application chez l'homme (Cai et al., 2008).

### **c. Les dérivés des stilbènes**

Les dérivés des stilbènes (**Fig. 14**) ont également suscités l'intérêt de certaines équipes. Ainsi, le SB-13, marqué au carbone 11, a démontré une bonne pénétration cérébrale chez le rat (Ono et al., 2003). Les autoradiographies *in vitro* menées sur des cerveaux de patients décédés de la MA et sur des coupes de cerveaux de souris transgéniques ont mis en évidence la spécificité ( $K_d$  = 2,4 nM) de sa liaison aux plaques amyloïdes (Kung et al., 2004a). Cependant, du fait de la demi-vie courte du carbone 11 (20,4 min), les radiotraceurs carbonés ne peuvent être radiosynthétisés et utilisés que dans les centres disposant d'un cyclotron. Compte tenu de cette limitation, des tentatives de marquage au fluor 18 ont été réalisées et ont abouties au FMAPO marqué au fluor 18 (Zhang et al., 2005). Ce radiotraceur montre une excellente pénétration cérébrale (9,75% de la dose injectée par grammes de tissu (% ID/g) à 2 min), un rapide "washout" du cerveau (0,72% ID/g à 60 min) et une liaison spécifique aux plaques, sur des homogénats et des coupes de cerveaux de patients décédés de la MA. Cependant, les études de biodistribution ont montré une fixation osseuse importante, révélatrice d'une défluoration *in vivo* (Zhang et al., 2005). Récemment, un autre dérivé marqué au fluor 18 a été développé, le [ $^{18}\text{F}$ ]BAY94-9172. Il a montré toutes les caractéristiques nécessaires pour être utilisé en imagerie TEP. De plus, son marquage au fluor 18 ouvre des perspectives d'utilisation clinique plus adaptées à la routine (Rowe et al., 2008).



**Figure 14.** Structures chimiques de base des dérivés des stilbènes, des vinylbezoxazoles et des aminonaphtyls (DDNP).

#### d. Les dérivés des vinylbezoxazoles

Les dérivés des vinylbezoxazoles (BF-168) (**Fig. 14**) ont récemment montré des propriétés intéressantes (Okamura et al., 2004a, 2004b, 2005; Shimadzu et al., 2004). Le BF-168 marqué au fluor 18 a montré une pharmacocinétique et une biodistribution adéquate chez des souris saines (Okamura et al., 2004b). Cependant, une fixation non-spécifique dans la substance blanche a été mise en évidence en autoradiographie *ex vivo* sur des coupes de cerveaux de rats sains (Shimadzu et al., 2004). Après quelques modifications chimiques, le BF-227 a corrigé les défauts du BF-168 et a démontré toutes les capacités requises pour être, à priori, un bon traceur des plaques amyloïdes: (1) Une affinité de l'ordre du nanomolaire pour les deux principales formes du peptides A $\beta$  (1-40) et A $\beta$  (1-42), (2) une bonne pénétration cérébrale (7,9 % ID/g à 2min), (3) un bon "washout" cérébral (0,72% ID/g à 60min), (4) ainsi qu'une liaison spécifique constatée en autoradiographie *in vitro* sur des cerveaux de patients décédés de la MA (Furumoto et al., 2005; Kudo et al., 2007).

#### e. Les dérivés des aminonaphtyls (DDNP)

Le 2-(1-(6-(diméthylamino)naphthalèn-2-yl)éthylidène)malononitrile (DDNP) (**Fig. 14**) est un composé neutre, lipophile et fluorescent. Un dérivé fluoré, le FDDNP, a été testé comme traceur des plaques amyloïdes (Agdeppa et al., 2001, 2003a; Liu et al., 2007). Les études sur cerveaux de patients Alzheimer par détection de la fluorescence native du FDDNP ont révélé qu'il marque les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires. Des études de compétition du FDDNP marqué au fluor 18 avec la chrysamine G et la ThT ont révélé un site de liaison différent, aux agrégats amyloïdes A $\beta$  (1-40) (Agdeppa et al., 2003b). Ainsi, le FDDNP a montré la capacité de se lier à deux sites des peptides synthétiques A $\beta$  (1-40): un site à haute affinité ( $K_i = 0,12$  nM) et un à basse affinité ( $K_i = 1,9$  nM). Son affinité révélée

par des études sur des homogénats de cerveaux Alzheimer est de 0,75 nM (Agdeppa et al., 2003b). Cependant, peu de données ont été rapportées jusqu'à présent sur sa pharmacocinétique chez le petit animal.

#### **4. La liaison aux fibrilles A $\beta$**

Il ressort de ces études évaluant les différentes caractéristiques de liaison aux fibrilles A $\beta$  qu'il existe plusieurs sites de liaison pour les radiotraceurs (Lockhart et al., 2004) et qu'ils sont présents en faible densité le long des fibrilles A $\beta$  (1 site de liaison tous les 400-2000 monomères A $\beta$ ) (Agdeppa et al., 2001; Zhuang et al., 2001). L'existence de sites de liaison différents sur des fibrilles A $\beta$  *in vitro* soulève la question de savoir si elle serait le reflet de variations lors de l'assemblage de ces peptides amyloïdes en plaques séniles *in vivo* (Lockhart et al., 2004). D'autre part, la multiplicité des modifications post-traductionnelles des peptides A $\beta$  (Kuo et al., 1997, 1998) ainsi que la présence de protéines accessoires au sein des plaques séniles (Liao et al., 2004) participent probablement à un contrôle de cet assemblage en plaques amyloïdes *in vivo*.

### **C. L'imagerie préclinique**

Compte tenu des résultats encourageants obtenus *in vitro* par certaines molécules candidates, des études en imagerie microTEP ont pu être réalisées. Deux études ont évalué les capacités du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB à détecter la charge amyloïde chez 2 modèles de souris transgéniques. La souche Tg2576 surexprimant une forme mutée de l'APP (Toyama et al., 2005) et la souche double transgénique pour le gène de l'APP et de PS1 (Klunk et al., 2005). De manière inattendue, chez ces deux modèles de souris transgéniques, le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB a montré une faible capacité de liaison aux plaques amyloïdes conduisant à l'impossibilité de différencier les souris saines des souris malades. Une explication possible à ce manque de sensibilité du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB pourrait être la faible densité de sites de liaison à haute affinité chez les souris transgéniques par rapport à celle trouvée les cerveaux humains. Chez les souris transgéniques, un site de liaison du PIB à haute affinité pour 1000 molécules de peptides A $\beta$  a été rapporté. En comparaison, ils en existeraient plus de 500 (pour 1000 molécules de peptides A $\beta$ ) dans les cerveaux de patients décédés de la MA (Klunk et al., 2005). Ainsi, la dose traceuse utilisée, la faible efficacité de détection de la microTEP (2%) et le nombre réduit de sites de liaisons à haute affinité chez les

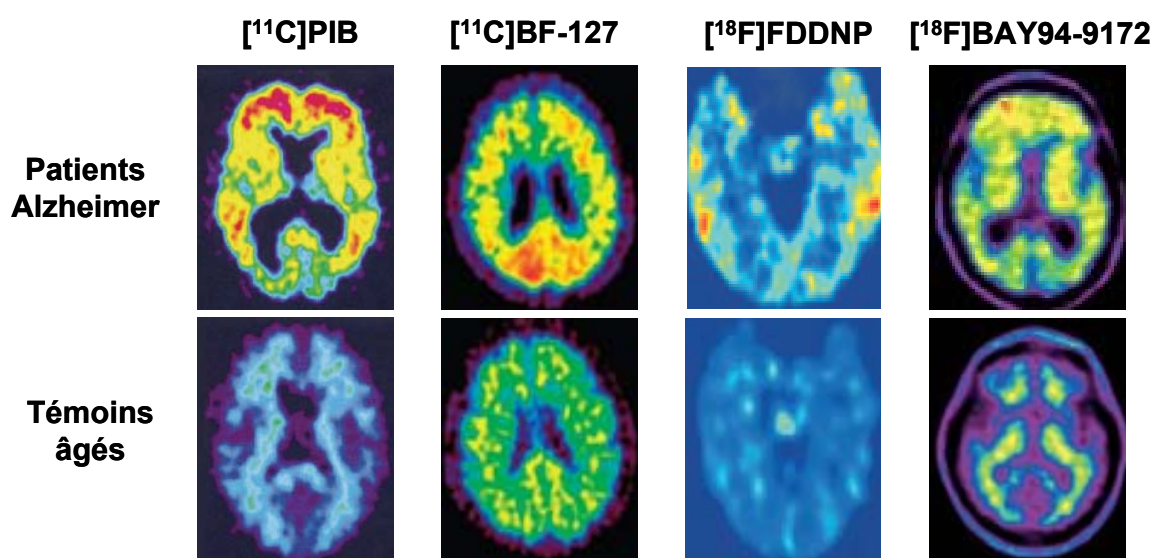
souris transgéniques, pourrait expliquer l'absence de rétention du PIB chez ces modèles murins. Cependant, une étude récente au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB s'est intéressée à l'imagerie microTEP de souris transgéniques (Tg2576) à un âge plus avancé (28 mois), et à réussi à mettre en évidence un rapport de 1,8 entre le cortex cérébral et le cervelet (ce qui est très correct) (Cai et al., 2006). Une autre équipe japonaise a réussi à radiosynthétiser le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB avec une activité spécifique très élevée permettant de détecter la pathologie amyloïde de souris transgéniques en microTEP (Maeda et al., 2007a). Venant conforter ce résultat, une étude TEMP utilisant le [ $^{125}\text{I}$ ]IMPY a montré qu'il était possible de détecter les plaques amyloïdes chez des souris double transgéniques PS1/APP (Kung et al., 2004b). Chez un modèle d'injection intracérébrale de peptides A $\beta$  (1-42) chez le rat, l'utilisation du [ $^{18}\text{F}$ ]BF-168 a également permis de visualiser l'accumulation du peptide en autoradiographie *ex vivo* (180 min post-injection du traceur) 6 jours après l'injection des peptides (Shimadzu et al., 2004). Récemment, une étude utilisant un dérivé du PIB marqué au fluor 18 ([ $^{18}\text{F}$ ]O-Fet-PIB) a réussi à détecter les agrégats de peptides A $\beta$  (1-40) injectés intracérébralement chez des rats en imagerie microTEP (Zheng et al., 2008). Cependant, des faits récents pourraient compliquer l'extrapolation des données de l'imagerie préclinique vers la clinique. En effet, les dépôts de peptides amyloïdes d'origine humaine chez les souris doubles transgéniques PS1/APP ne recouvrent pas totalement les mêmes régions cérébrales que les peptides amyloïdes d'origine murine chez les souris simples transgéniques (Van Groen et al., 2006).

## D. L'imagerie clinique

A ce jour, trois radiotraceurs marqués au carbone 11 ([ $^{11}\text{C}$ ]PIB, [ $^{11}\text{C}$ ]SB-13, [ $^{11}\text{C}$ ]BF-227) et deux marqués au fluor 18 ([ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP et [ $^{18}\text{F}$ ]BAY94-9172) ont pu poursuivre leur évaluation préliminaire en clinique.

Parmi ceux-ci, le traceur ayant été le plus largement étudié chez l'homme a été certainement le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (**Fig. 15**). La première étude clinique au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB a été réalisée sur 15 patients atteints de la MA et 9 sujets sains (Klunk et al., 2004). Elle a montré une différence significative dans l'accumulation du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB au niveau cortical (cortex frontal, pariétal, temporal, occipital) et sous-cortical (striatum) chez des patients atteints de la MA en comparaison des sujets sains (1,5 – 1,9 fois supérieure). Aucune différence n'a été mise en évidence dans les régions du pons et de la substance blanche entre ces deux populations. Cette étude initiale a été suivie et confirmée par d'autres études dans différents centres (Archer et

al., 2006; Edison et al., 2007; Engler et al., 2006; Kemppainen et al., 2006; Lopresti et al., 2005; Mintun et al., 2006; Price et al., 2005; Ziolkowski et al., 2006). Une de ces études a montré que des patients atteints de la MA avaient un niveau stable de charge amyloïde 2 ans après leur premier examen alors que leur métabolisme cérébral (suivi par [ $^{18}\text{F}$ ]FDG) et leurs performances cognitives se dégradaient (Engler et al., 2006). D'autre part, une étude a montré que des sujets non-déments pouvaient également révéler un marquage important au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (Mintun et al., 2006). Ces études ont démontré que l'accumulation de plaques amyloïdes progresse de manière silencieuse jusqu'à atteindre un plateau. Au-delà de cette charge amyloïde maximale, le cerveau n'est plus capable de compenser les perturbations induites. Son métabolisme et les fonctions cognitives qu'il assure s'en retrouvent dégradés.



**Figure 15.** Exemples d'images obtenues par examen TEP clinique au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (Small et al., 2008), au [ $^{11}\text{C}$ ]BF-127 (Kudo et al., 2007), au [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP (Small et al., 2006) et au [ $^{18}\text{F}$ ]BAY94-9172 (Rowe et al., 2008) montrant l'accumulation de la charge amyloïde chez des patients atteints de la MA (en haut) en comparaison de témoins âgés (en bas). (NB: les images TEP cliniques au [ $^{11}\text{C}$ ]SB-13 ne sont pas accessibles).

Des études se sont ensuite intéressées à des patients atteints de troubles cognitifs légers (ou MCI) qui, comme nous l'avons vu, sont censés représenter le stade prodromique de la MA (Forsberg et al., 2007; Kemppainen et al., 2007; Li et al., 2008). Ces études ont montré qu'en moyenne, l'accumulation de plaques amyloïdes chez une population atteinte de MCI était intermédiaire entre celle de sujets sains et celle de patients atteints de la MA. Les patients MCI ayant progressé vers une MA (constaté de 2 à 16 mois après l'examen au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB) présentaient un niveau d'accumulation de peptides  $\text{A}\beta$  supérieur à ceux n'ayant pas convertis,

et supérieur aux sujets sains. D'autre part, ils étaient tous des MCI de type "amnésique", comme défini précédemment. Ces résultats suggèrent que l'imagerie TEP des plaques amyloïde au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB permet de détecter précocement, chez les patients atteints de troubles cognitifs légers de type amnésique, ceux susceptibles de développer une MA. On peut raisonnablement espérer que, lorsque des méta-analyses seront disponibles, elles pourront déterminer si les sujets sains (non-déments, asymptomatiques) présentant un niveau élevé de fixation du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, ont développés par la suite une MA.

Le second traceur carboné ayant fait l'objet d'une évaluation clinique (quoique moins documentée) est le [ $^{11}\text{C}$ ]SB-13. Ses capacités pour détecter l'accumulation de peptides A $\beta$  ont été évaluées et comparées à celles du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (Verhoeff et al., 2004). Les études réalisées chez 5 patients atteints de la MA et 6 sujets sains ont montré que le [ $^{11}\text{C}$ ]SB-13 et le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB reflétaient de façon similaire la charge amyloïde dans les régions du cortex frontal et occipital.

Plus récemment, le [ $^{11}\text{C}$ ]BF-127 a pu être testé en clinique (**Fig. 15**) sur des patients atteints de la MA et sur des sujets sains (Kudo et al., 2007). La fixation du traceur chez les patients Alzheimer a été importante au niveau du cortex frontal, temporal et pariétal par rapport aux sujets sains. Ces régions sont connues pour être riches en plaques neuritiques (Arnold et al., 1991). Sa fixation au niveau du cervelet a été comparable dans les deux groupes. L'évaluation du [ $^{11}\text{C}$ ]BF-127 pour détecter la pathologie amyloïde s'est révélée être concluante.

Le [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP a été le premier radiotraceur TEP à montrer *in vivo* (**Fig. 15**) la capacité de marquer les deux lésions caractéristiques (SP et DNF) dans le cerveau de patients atteints de la MA (Barrio et al., 2006; Shoghi-Jadid et al., 2002). Il a montré un marquage intense et spécifique au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex entorhinal de patients atteints de la MA. Les régions marquées *in vivo* sont celles connues pour être touchées par les 2 lésions caractéristiques. De plus, une étude a montré que le [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP semblait capable de différencier les personnes atteintes de MCI, de celles atteintes d'une MA, et de celles sans troubles cognitifs (Small et al., 2006). Cependant, le signal spécifique obtenu avec le [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP n'a été démontré que 0,3 fois plus important que celui non-spécifique. En comparaison, le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB et le [ $^{11}\text{C}$ ]SB-13 permettent d'atteindre des facteurs de l'ordre de 1,5 à 2 (fixation région spécifique / fixation région de référence).



Actuellement, le traceur le plus récent ayant fait l'objet d'études cliniques chez des patients atteints de la MA est le [ $^{18}\text{F}$ ]BAY94-9172 (Rowe et al., 2008) (**Fig. 15**). Ce traceur fluoré a montré une forte fixation chez des patients Alzheimer au niveau néocortical, notamment dans les régions du cortex cingulaire postérieur et du cortex frontal, en comparaison d'une fixation localisée dans la substance blanche chez les sujets sains et les patients atteints de dégénérescences lobaires fronto-temporales.

Ainsi, l'imagerie TEP des plaques amyloïdes ne permet pas le diagnostic précoce d'une MA. Elle est une aide au diagnostic. Par contre, ce qui est fondamental pour la recherche actuelle, c'est que cette imagerie va être (est déjà) l'outil de choix pour l'évaluation des thérapeutiques visant à réduire la pathologie amyloïde, notamment présente dans la MA.





## II. L'automatisation de la radiosynthèse du $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$

### A. Contexte

Le CERMEP est un centre d'imagerie multimodale qui dispose d'un cyclotron rendant possible la production et l'utilisation de radiotraceurs marqués au carbone 11. Du fait des bonnes caractéristiques du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  (précédemment décrites) pour l'imagerie TEP des plaques amyloïdes dans la MA, nous avons décidé de mettre en place au CERMEP sa radiosynthèse. De plus, dans un souci de mise à disposition de ce radiotraceur à des protocoles cliniques et précliniques, nous avons voulu mettre en place l'automatisation (et l'optimisation) de sa radiosynthèse grâce à deux automates fournis par l'entreprise Bioscan® (MeI-Plus™ et AutoLoop™) dans le cadre de ma bourse CIFRE.

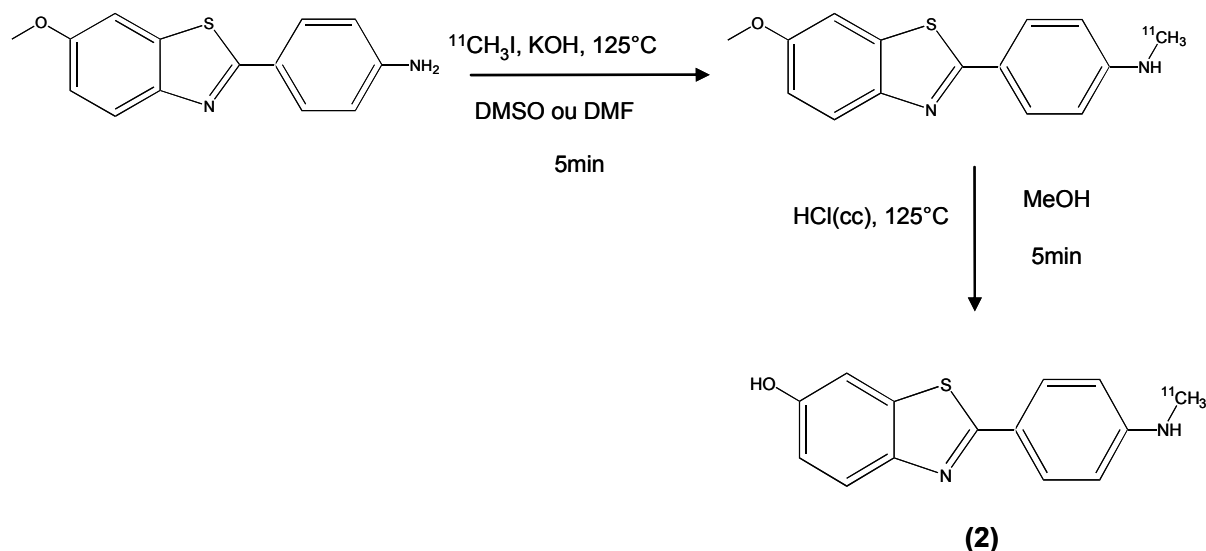
Les deux automates sont des prototypes dans leur version précommerciale "série 001":

- Un automate de méthylation (MeI-Plus™) permet la radiosynthèse de l'iodure de  $^{11}\text{C}$ -méthyle ( $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ ) ou de triflate de  $^{11}\text{C}$ -méthyle ( $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ ) sous forme de gaz, à partir de dioxyde de carbone 11 ( $^{11}\text{CO}_2$ ) gazeux fournit par le cyclotron.
- Une boucle de synthèse (AutoLoop System™) permet le radiomarquage du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  à partir du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  fourni par le premier automate.

### 1. La radiosynthèse originale

La radiosynthèse originale du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  a été décrite par Mathis et al. (2003) à l'Université de Pittsburgh (**Fig 16**). Cette synthèse nécessitait la protection de la fonction phénol du précurseur par une fonction éther. L'incorporation du méthyle radioactif sur l'amine s'effectuait avec du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  en milieu basique dans 400  $\mu\text{L}$  de diméthylsulfoxyde anhydre ( $\text{DMSO}_{\text{anh}}$ ) ou de *N*-*N*diméthylformamide anhydre ( $\text{DMF}_{\text{anh}}$ ) à 125°C pendant 5 min. La déprotection était réalisée en milieu acide pendant 5 min supplémentaires à 125°C. Le rendement radiochimique du marquage était de 10-12% (basé sur la quantité de  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  introduite), l'activité spécifique (AS) du produit en fin de synthèse de 85  $\text{GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$  et les

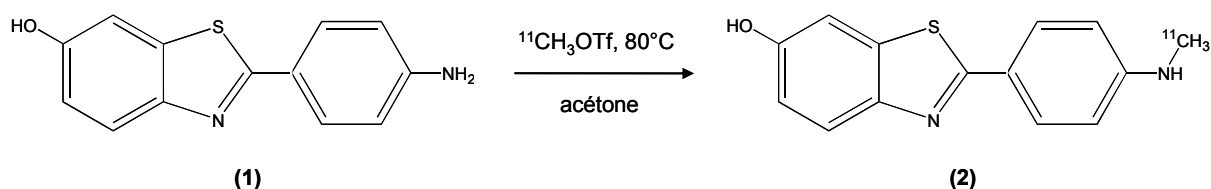
puretés radiochimiques et chimiques supérieures à 95%. Cependant, cette synthèse, bien qu'ayant des rendements intéressants, nécessitait plusieurs étapes et était difficilement automatisable.



**Figure 16.** Synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (2) selon Mathis et al. (2003).

## 2. L'utilisation du triflate de méthyle

Les travaux suivants effectués par d'autres équipes (Solbach et al., 2005) ont permis d'augmenter le faible rendement radiochimique et la rapidité de la réaction (**Fig. 17**). Solbach s'est appuyé sur une étude antérieure (Wilson et al., 2004) en utilisant le  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ , très réactif, à la place du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  et en éliminant l'étape de protection de la fonction phénol. De cette manière, le rendement radiochimique (par rapport au  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ ) du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB a pu être élevé de 10-12% à 56-60% et le temps de réaction a été diminué de 10 min à 1 min. La pureté radiochimique (>95%) et l'AS (80-120 GBq. $\mu\text{mol}^{-1}$ ) sont restées inchangées. Mais, malgré ces améliorations, le temps de radiosynthèse après la fin du bombardement (EOB pour end of bombardment en anglais) était de 40 min et la quantité de précurseur engagé restait importante (4 à 8 mg).

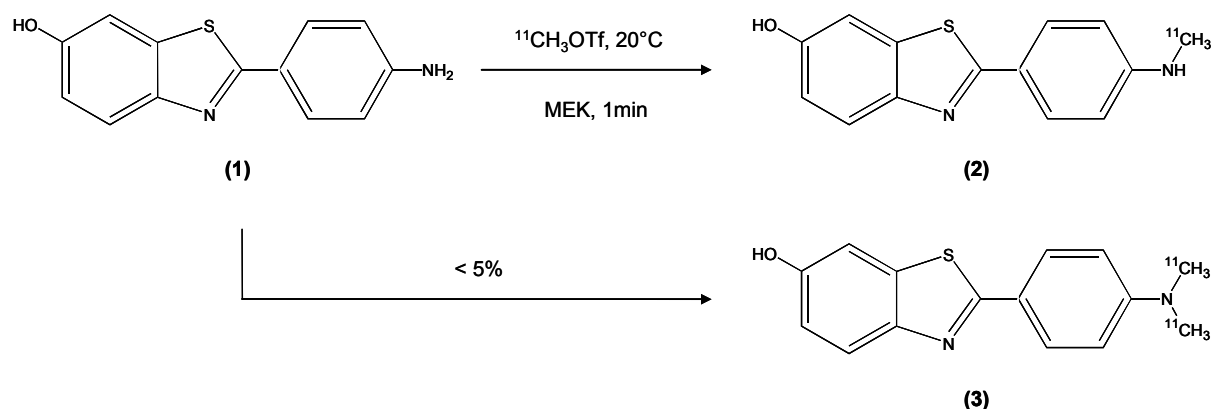


**Figure 17.** Synthèse améliorée du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (2) à partir de son précurseur non-protégé (1) selon Solbach et al. (2005).

### 3. L'utilisation d'une boucle HPLC

Une technique de synthèse particulière, à partir du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ , a été mise au point par Wilson et al. (2000) dans le cadre de la synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]raclopride (traceur des récepteurs dopaminergiques  $\text{D}_2$ ). L'originalité de cette méthode réside dans l'utilisation d'une boucle d'injection HPLC qui tient lieu de réacteur de radiosynthèse. Le précurseur non radioactif est dissout dans un volume très faible de solvant (80  $\mu\text{L}$ ), puis lentement injecté dans une boucle de 2 mL pour lui permettre de tapisser la surface interne de celle-ci. Un flux de  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  gazeux pénètre alors dans la boucle où la réaction de marquage a lieu. Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est directement injecté dans une colonne préparative afin de purifier le produit synthétisé. Cette technique de synthèse simplifie les manipulations tout en permettant d'obtenir des rendements élevés.

Ainsi, cette méthode de synthèse semi-automatique a été appliquée à la synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (Wilson, 2004). La réaction de marquage (**Fig. 18**) a été réalisée avec du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ , préparé manuellement, en 1 min à température ambiante, sans protection de la fonction phénol. Dans ces conditions, la pureté radiochimique (>95%) et l'AS (30-60  $\text{GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ) étaient comparables aux synthèses totalement manuelles. Le rendement radiochimique était de 11-16% (basé sur la quantité de  $^{11}\text{CO}_2$  engagée) pour une durée totale de réaction 22 min. Cette technique de synthèse manuelle du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB offrait un rendement radiochimique excellent et une possibilité très simple d'automatisation.



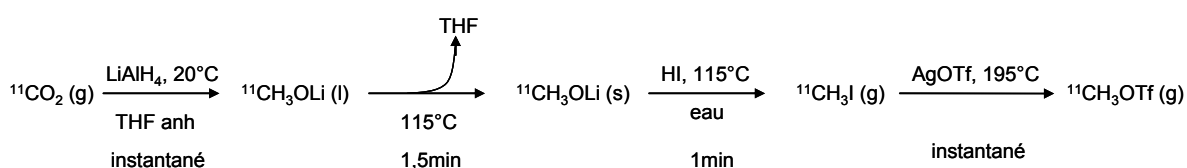
**Figure 18.** Synthèse du  $[^{11}\text{C}]$ PIB (2) en boucle HPLC selon Wilson et al. (2004) à partir du précurseur non-protégé. Le composé di-méthylé (3) est produit en quantité faible (<5%).

## B. Objectifs

Nos travaux d'automatisation et d'optimisation de la radiosynthèse du  $[^{11}\text{C}]$ PIB se positionnent dans la continuité des travaux que nous venons de passer en revue. L'automatisation complète, c'est à dire de la synthèse du  $[^{11}\text{C}]$ PIB et le lavage automatique des modules, en un minimum de temps, constitue notre premier objectif. Une fois la synthèse automatisée, l'objectif second réside dans l'optimisation des paramètres de synthèse assurant une reproductibilité et une fiabilité permettant plusieurs radiosynthèses successives en une journée.

## C. Matériels et Méthodes

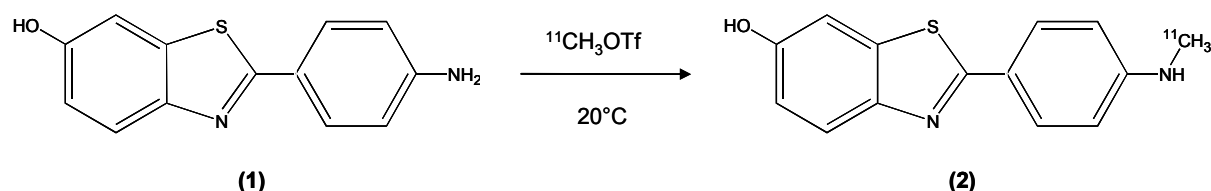
La radiosynthèse du  $[^{11}\text{C}]$ PIB est effectuée en enceinte blindée par un premier automate de méthylation (MeI-Plus™, Bioscan®, USA) effectuant la réaction chimique décrite par Crouzel (1987).



**Figure 19.** Schéma réactionnel de la synthèse du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  par l'automate de méthylation.

Le  $^{11}\text{CO}_2$  (dioxyde de carbone 11) gazeux, précurseur primaire produit par réaction nucléaire  $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$  à l'aide du cyclotron, est piégé sur tamis moléculaire à température ambiante, permettant une purification du flux entrant. Le  $^{11}\text{CO}_2$  est ensuite relargué en chauffant le tamis moléculaire à  $250^\circ\text{C}$  puis est piégé dans une solution d'hydrure de lithium-aluminium ( $\text{LiAlH}_4$ ) dans du tétrahydrofurane (THF) anhydre. Le milieu est ensuite porté à  $115^\circ\text{C}$  afin d'évaporer le THF. A ce stade, des sels blancs sont observés dans le réacteur. L'organométallique ainsi formé est hydrolysé libérant du  $^{11}\text{C}$  méthanol ( $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ ) qui réagit avec l'acide iodhydrique (HI) chauffé à  $115^\circ\text{C}$  pour former du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  (iodure de méthyle marqué au carbone 11). Le  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  est ensuite transformé en  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  (méthyl-trifluorométhanesulfonate ou méthyl-triflate marqué au carbone 11) par passage sur une colonne de triflate d'argent ( $\text{AgOTf}$ ) chauffé à  $175^\circ\text{C}$  (**Fig. 19**). Le  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  est un composé beaucoup plus réactif que le  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ . Cette caractéristique lui procure l'avantage d'augmenter sa réactivité envers le précurseur. Néanmoins, il faut veiller à ce que le produit ne se décompose pas avant d'atteindre le précurseur. La synthèse du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  est de 12 min.

Une fois la production de  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  réalisée, un second automate, connecté en série (Autoloop<sup>TM</sup>, Bioscan®, USA), va permettre d'effectuer la réaction de radiomarquage du précurseur dans une boucle de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de capacité de 2 mL. Le précurseur (1 mg) dilué dans son solvant (80  $\mu\text{L}$  de cyclohexanone ou CHO) est introduit dans la boucle et tapisse la paroi interne de celle-ci permettant une diffusion optimale du gaz ( $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ ). La réaction mise en œuvre (**Fig. 20**) est une substitution nucléophile d'un groupement méthyle radioactif présent sur le  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  (provenant de l'automate de méthylation), sur l'amine primaire du 6-hydroxy-2-(4-aminophényl)benzothiazole (précurseur) (**1**) pour former le  $^{11}\text{C}$ PIB (2-(4'- $^{11}\text{C}$  méthylaminophényl)-6-hydroxybenzothiazole) (**2**). La réaction se déroule en 1 minute, à température ambiante.



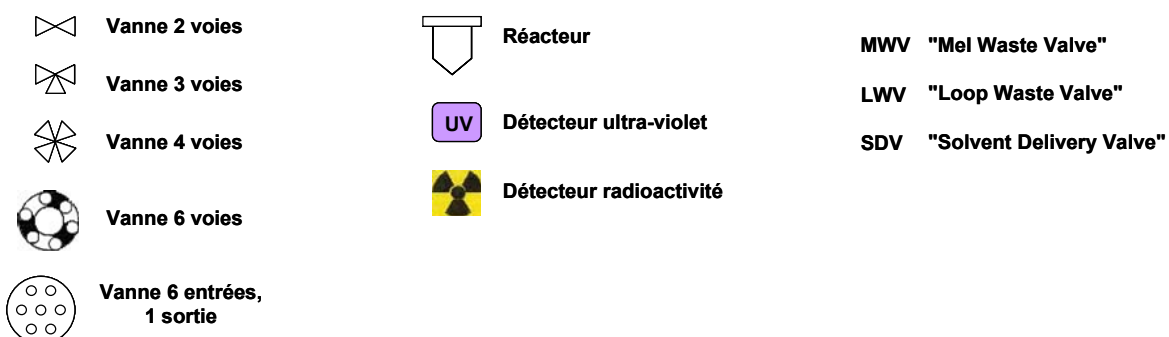
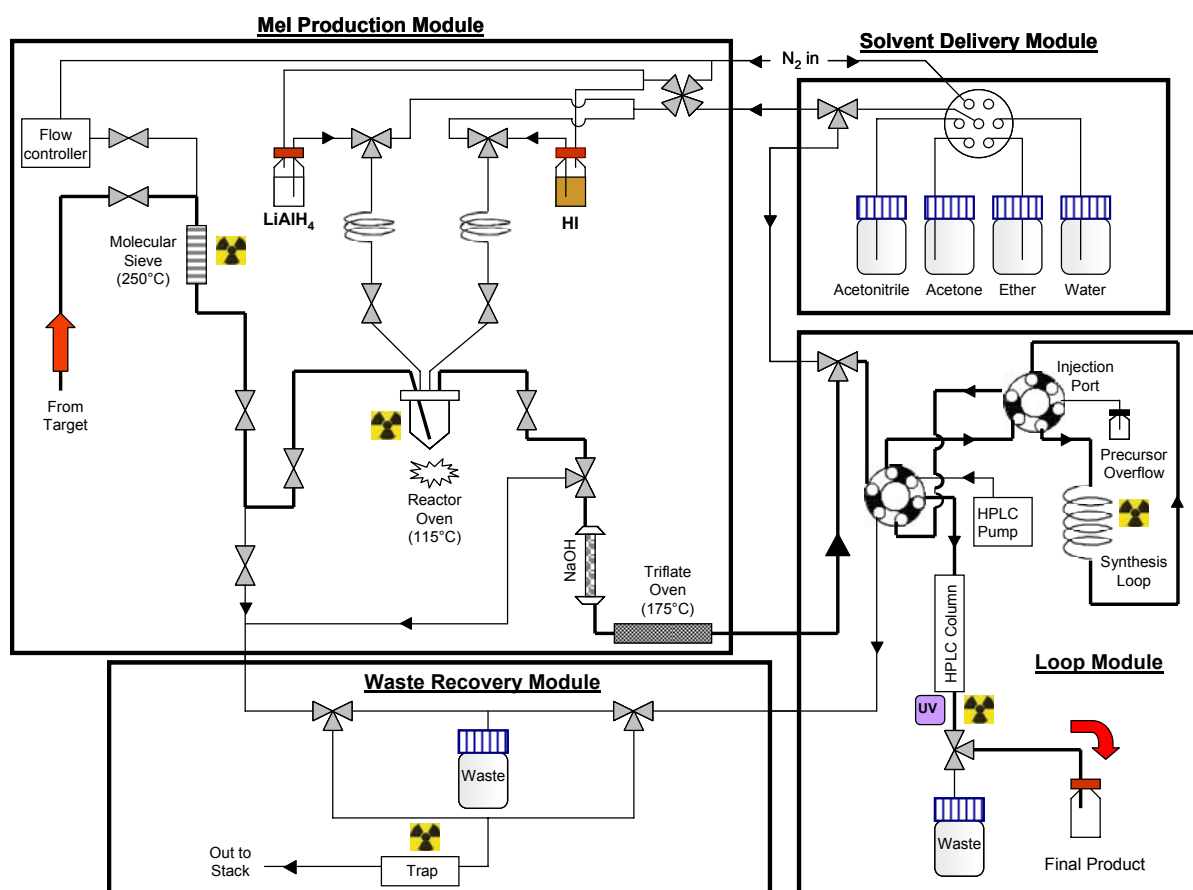
**Figure 20.** Réaction de synthèse du  $^{11}\text{C}$ PIB dans la boucle HPLC de l'automate.

Dès la fin de la réaction dans la boucle, le milieu réactionnel est directement injecté dans une colonne HPLC préparative pour purification du produit. La colonne en phase inverse (Waters, Symmetry Prep C18, 7  $\mu\text{m}$ , 7,8 x 300 mm) est couplée à un détecteur ultra-violet (UV) à 254 nm (Beckman HPLC-160) et à un détecteur de radioactivité (Hot Cell HC-003, Bioscan®, USA). Le temps d'élution du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB avec l'éluant choisi (acétonitrile/eau 50/50 à un débit de 3 mL.min<sup>-1</sup>) est d'environ 7 min.

La formulation manuelle du produit obtenu est réalisée comme décrit dans la littérature (Lemaire et al., 1999). Le produit récolté est dilué dans 40 mL d'eau stérile, chargé sur une cartouche SEP-Pak Light C18 (Waters, USA) puis élué avec 1 mL d'éthanol. Le produit final est dilué dans du sérum physiologique et stérilisé (filtre stérile Millex-GS, 0,22  $\mu\text{m}$ ).

La **Figure 21** représente un schéma du système complet de synthèse en partant du  $^{11}\text{CO}_2$  pour aboutir au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB purifié. L'association en série des deux modules présentés permet la mise en place d'une synthèse radioactive totalement automatisée, de l'introduction du  $^{11}\text{CO}_2$  à la molécule finale purifiée. La durée de synthèse totale du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB est de 20-25 min. Le système complet nécessite un lavage automatisé (acétonitrile, acétone et éther pour le MeI-Plus™ puis eau distillée et acétonitrile pour l'Auto-Loop™) d'une durée de 10 min après sortie du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB de la colonne préparative. Il est donc possible d'effectuer plusieurs synthèses de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB par journée d'examen, en tenant compte de la décroissance rapide du  $^{11}\text{C}$  (demi-vie de 20 min).

Lorsque le produit de synthèse est purifié, sa qualité est contrôlée grâce à une HPLC analytique. La colonne HPLC analytique utilisée est en phase inverse (Lichrosorb RP-18, 5  $\mu\text{m}$ , 4 x 250 mm) avec une phase mobile (acétonitrile/eau 40/60) circulant à un débit de 1,5 mL.min<sup>-1</sup> (System Gold PSM 126, Beckman). Elle est couplée à un détecteur UV à 254 nm (Beckman, modèle System Gold Detector 168), et à un détecteur de radioactivité (Beckman, modèle 170 Radioisotope Detector). Dans nos conditions expérimentales, le temps d'élution du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB est de 8,2 min.



**Figure 21.** Schéma du procédé de synthèse avec le couplage des modules (MeI-Plus™ et AutoLoop System™).



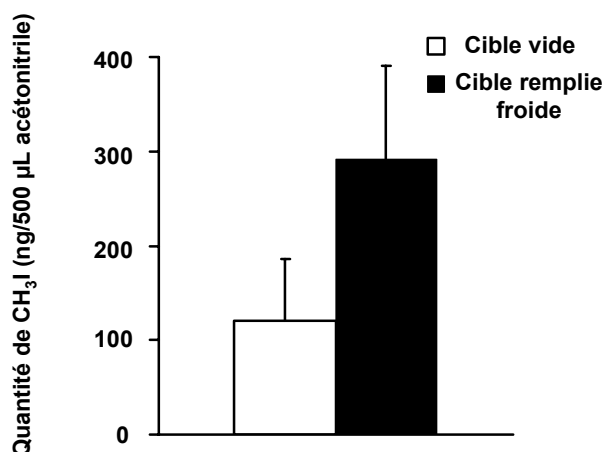
## D. Résultats

### 1. Automate de méthylation (MeI-Plus™, Bioscan®)

Les paramètres de production d'iodure de méthyle avaient déjà fait l'objet de développements par le Dr Vincent Tadino (Bioscan®) et ne seront pas exposés ici. Mes premiers travaux ont consistés à évaluer la reproductibilité de production d'iodure de méthyle "froid" (non-radioactif), et déterminer les causes potentielles d'une faible activité spécifique obtenue par cet automate. Ces tests effectués à froid avaient également pour but de me permettre de me familiariser avec l'automate sans manipulation de radioactivité.

#### a. Détermination de l'influence du CO<sub>2</sub> libre sur la production de CH<sub>3</sub>I

Le remplissage de la cible, sans effectuer de tir au niveau du cyclotron (absence de <sup>11</sup>CO<sub>2</sub>), et l'utilisation de ce volume de gaz, conduit à une augmentation de +140% de la production de CH<sub>3</sub>I par l'automate. La production de CH<sub>3</sub>I est de 121 ± 64 ng cible vide et de 291 ± 99 ng lorsque la cible a été remplie (Fig. 22).

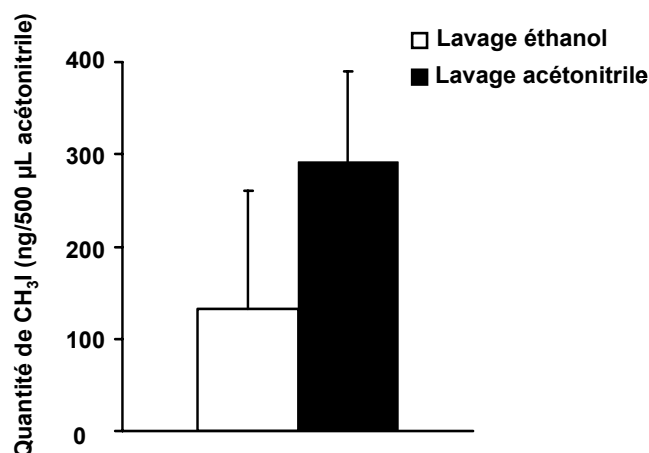


**Figure 22.** Influence du remplissage de la cible (non-radioactive ou "froide") sur la quantité de CH<sub>3</sub>I (ng) produite, dans 500 µL d'acétonitrile.

#### b. Détermination de l'influence de l'éthanol sur la production de CH<sub>3</sub>I

Le passage de l'éthanol à l'acétonitrile (un des solvants de lavage) supprime la production d'iodure d'éthyle (résultats non montrés) et améliore la production de CH<sub>3</sub>I de +120%. Elle est

passée de  $132 \pm 128$  ng à  $291 \pm 99$  ng d'iodure de méthyle dans 500  $\mu$ L d'acétonitrile (**Fig. 23**).



**Figure 23.** Détermination de l'influence du changement de solvant de lavage (éthanol ou acétonitrile) sur la production de  $\text{CH}_3\text{I}$  (en ng/500  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile).

### c. Détermination des paramètres de production de $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$

Les conditions permettant une synthèse de  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  optimale avaient été déterminées par une étude antérieure du Dr Vincent Tadino (Bioscan®) et sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**).

Paramètre	Valeur	Paramètre	Valeur
Temps introduction $\text{LiAlH}_4$	300 ms	Temps évaporation THF	90 s
Temps introduction HI	700 ms	Débit de distillation	12 ml/min
Temps capture $^{11}\text{CO}_2$	120 s	Température tamis moléculaire chaud	250 °C
Débit dégagement $^{11}\text{CO}_2$	12 ml/min	Température four du réacteur	115 °C
Temps relargage $^{11}\text{CO}_2$	150 s	Température four colonne triflate d'argent	170 °C

**Tableau 1.** Conditions de production de  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  sur l'automate MeI-Plus™.

Il est utile de noter que le temps de distillation du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  peut varier d'une expérience à l'autre. En effet, l'arrêt du flux de distillation s'effectue lorsque la quantité de radioactivité dans la boucle de synthèse atteint son maximum. Le temps de distillation peut également varier entre 1,5 et 4 min. De la même manière, le temps d'évaporation du THF peut lui aussi varier entre 90 et 120 sec selon la performance de chauffage du four du réacteur. Ces

conditions de synthèse de  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  sont jugées optimales et seront appliquées pour toutes les expériences suivantes.

## 2. Boucle de synthèse (AutoLoop™, Bioscan®)

### a. Optimisations préliminaires

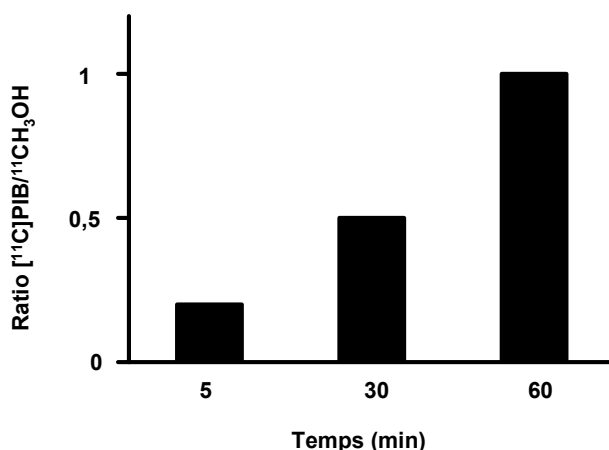
Pour limiter les irradiations perçues lors des expériences d'optimisation de différents paramètres de synthèse, de faibles tirs de cyclotrons de 2,5 à 6  $\mu\text{A}$  (10 min) ont été effectués. Nous avons considéré que ces paramètres optimisés (séchage, solvants, quantité de précurseur et temps de réaction) seront applicables aux conditions de tirs réalisés en routine lors d'examens TEP.

#### ♦ Conversion du $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ en $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$

Pour déterminer la conversion du  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$  en  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ , nous avons collecté le milieu réactionnel de production dans un flacon hermétique, rempli avec un mélange acétonitrile/eau (50/50) (l'eau permettant l'hydrolyse du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  en  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ ). Puis, une analyse par HPLC à détection UV et radioactive (phase liquide: acétonitrile/eau 40/60) a été effectuée sur ce milieu réactionnel et a confirmé l'unique présence de méthanol radioactif et l'absence de  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ .

#### ♦ Séchage

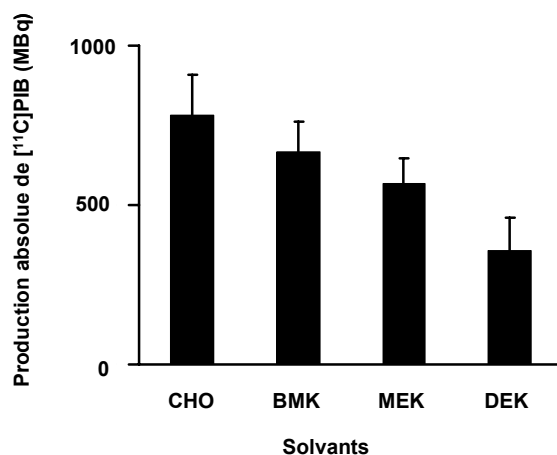
Nous avons constaté lors de nos premiers essais de synthèse de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  (avec 1 mg de précurseur dans 80  $\mu\text{L}$  de CHO) que plus de 70% de la radioactivité produite était représentée par du  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ . Le  $\text{CH}_3\text{OTf}$  étant très sensible à l'eau, nous avons tenté de déterminer la provenance de cette eau et d'en réduire les conséquences. Le séchage du CHO avec du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) anhydre n'a pas réduit la proportion de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  produite. L'étape suivante a consisté à évaluer l'influence du séchage des lignes de l'automate allant de la colonne de triflate d'argent (à partir de la vanne V18 sur le schéma de la **Fig. 21**) à la sortie de la boucle de synthèse, par une circulation d'azote à 1 bar pendant 5, 30 ou 60 min. Les ratios  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}/^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  produits furent respectivement de 0,2, 0,5 et 1 (**Fig. 24**).



**Figure 24.** Influence du temps de séchage (lignes entre la colonne de triflate d'argent et la sortie de la boucle) sur le ratio [ $^{11}\text{C}$ ]PIB/ $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  ( $n = 1$ ).

#### ♦ Choix du solvant

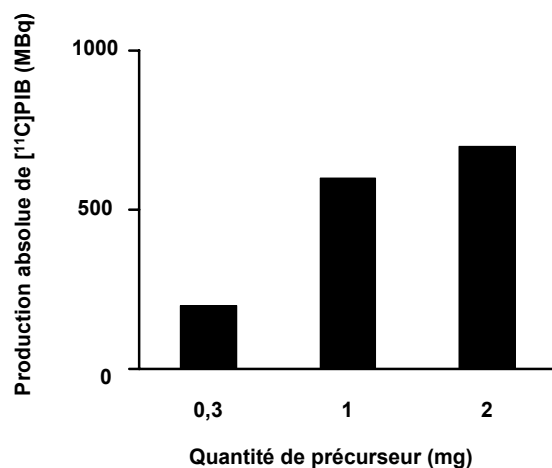
Nous avons comparé les effets de différents solvants de synthèse sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB en sortie de boucle. Pour une reproductibilité et une comparaison optimum des résultats, le volume de solvant a été fixé à 80  $\mu\text{L}$ , la quantité de précurseur à 1 mg, le temps de réaction dans la boucle à 15 sec et un séchage de 60 min a été effectué. Le  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  (diméthylsulfoxyde anhydre) et le  $\text{DMF}_{\text{anh}}$  (diméthylformamide anhydre) n'ont pas permis la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB. Le DPK (dipropylcétone ou 4-heptanone) n'a pas réussi à solubiliser le précurseur. Différentes cétones, CHO (cyclohexanone), BMK (butylméthylcétone ou 2-hexanone), MEK (méthyléthylcétone ou 2-butanone) et DEK (diéthylcétone ou 3-pentanone) ont produit respectivement  $781 \pm 126$  MBq,  $666 \pm 94$  MBq,  $568 \pm 78$  MBq et  $359 \pm 102$  MBq de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB absolu ( $n = 2$  pour chaque solvant) (**Fig. 25**).



**Figure 25.** Influence du solvant (CHO, BMK, MEK, DEK) sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (MBq) ( $n = 2$  pour chaque solvant).

### ♦ Quantité de précurseur

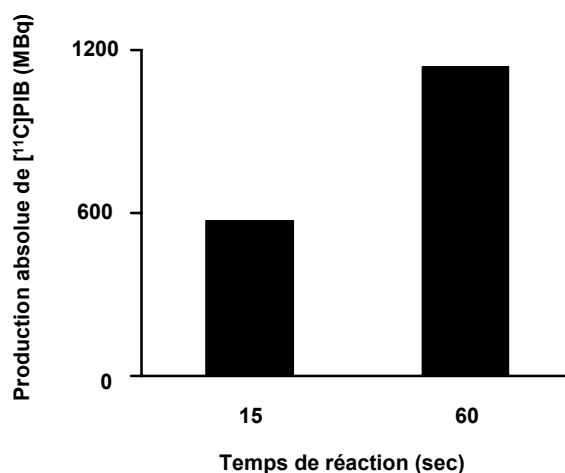
Nous avons voulu évaluer l'influence de la quantité de précurseur introduite dans la réaction de synthèse sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB. Les conditions de synthèse fixées étaient les suivantes: une étape de 60 min de séchage, 80  $\mu\text{L}$  de CHO comme solvant et 15 sec de temps de réaction dans la boucle. Les productions de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB furent de 200, 600 et 700 MBq avec 0,3, 1 et 2 mg de précurseur, respectivement (**Fig. 26**).



**Figure 26.** Influence de la quantité de précurseur (mg) sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (MBq) ( $n = 1$ ).

### ♦ Durée de la réaction

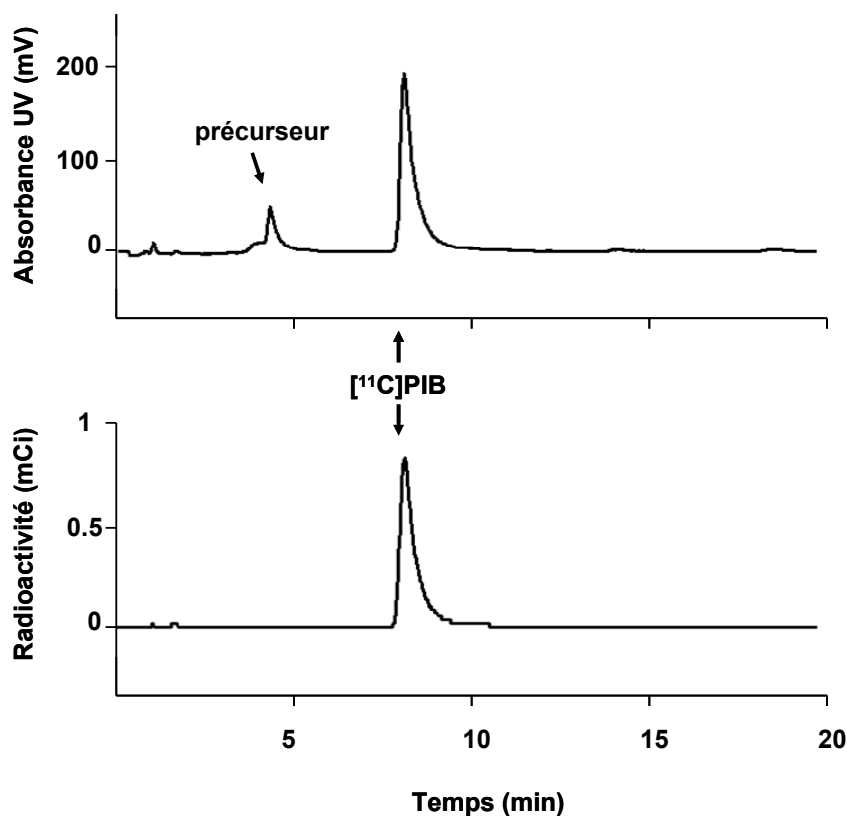
Nous avons finalement évalué l'influence du temps de réaction dans la boucle de synthèse sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB, avec 1 mg de précurseur dissout dans 80  $\mu\text{L}$  de CHO et une étape préalable de séchage de 60 min. Ainsi, augmenter le temps de réaction de 15 sec à 1 min a permis de doubler la quantité de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB produit (de 570 à 1140 MBq) (**Fig. 27**).



**Figure 27.** Influence du temps de réaction sur la production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (MBq) ( $n = 1$ ).

### **b. Radiosynthèse automatisée en routine**

Les conditions de radiosynthèse en routine impliquent un temps d'irradiation de la cible du cyclotron d'environ 1 heure pour atteindre 40  $\mu\text{A}$  de courant intégré. L'étape de séchage est donc effectuée durant cette période de tir au cyclotron. Les autres paramètres de réaction fixés sont l'introduction de 1mg de précurseur (dissous dans 80  $\mu\text{L}$  de solvant) puis 1 min de temps de réaction dans la boucle. Dans ces conditions, nous avons constaté que l'utilisation du CHO offrait de meilleures productions de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  (4986 MBq) que le MEK (1200 MBq). La formation du *O*- $[^{11}\text{C}]\text{méthylbenzothiazole}$  était de moins de 1% et pouvait être facilement séparée et éliminée lors d'une HPLC avec détection UV et radioactive donnant une pureté radiochimique  $\geq 99\%$  (**Fig. 28**). L'activité spécifique du produit final ( $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ ) était comprise entre 20 et 60  $\text{GBq}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$  et le rendement radiochimique de l'ordre de 13 à 15% (non-corrigé de la décroissance et basé sur la production de 40  $\text{GBq}$  de  $^{11}\text{CO}_2$ ).



**Figure 28.** Chromatogramme analytique du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ . Le temps de rétention du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  est de 8,2 min et sa pureté radiochimique supérieure à 99%. La détection radioactive est reportée en bas et la courbe d'absorbance à 254 nm dans l'ultra-violet (UV) est reportée en haut.

## E. Discussion

Le [ $^{11}\text{C}$ ]PIB est un radiotraceur synthétisé par l'Université de Pittsburgh en 2003 ([Mathis et al., 2003](#)) et ayant la capacité de fixer spécifiquement les plaques amyloïdes. Malgré son marquage au carbone 11, ses propriétés radiopharmacologiques font de ce radiotraceur une molécule très attractive pour l'évaluation de la charge amyloïde en imagerie TEP. Des demandes de protocoles de recherche chez des patients Alzheimer nous ont conduit à mettre en place sa synthèse au CERMEP.

Le but de mes travaux était donc de mettre en place la radiosynthèse entièrement automatisée du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB grâce à l'utilisation de deux modules de synthèse fournis par l'entreprise Bioscan®, un automate de méthylation (MeI-Plus™) et une boucle de synthèse (AutoLoop™). L'utilisation d'automates de synthèse est fréquente dans les centres de production de radiotraceur ou les centres d'imagerie TEP, car elle apporte de multiples avantages. (i) Elle limite l'intervention humaine, donc l'irradiation et (ii) elle autorise la reproductibilité et (iii) la multiplicité des radiosynthèses, ce qui permet d'envisager plusieurs examens d'imagerie TEP dans une même journée. Une fois l'automatisation mise en place, le second objectif consistait à optimiser ces conditions de radiosynthèses.

### 1. L'automate de méthylation (MeI-Plus™, Bioscan®)

Les premiers travaux ont consistés à déterminer les causes potentielles d'une faible activité spécifique obtenue par l'automate de méthylation. L'activité spécifique d'un radiotraceur correspond à l'activité radioactive (en Curie) de ce composé par rapport à sa quantité pondérale produite dans le produit final, marquée et non-marquée. Ainsi, une forte activité spécifique, correspondant à une faible concentration en radiotraceur pour une forte activité radioactive, permet d'injecter des doses traceuses et permet l'imagerie de cibles présentes à faible concentration.

Dans l'automate de méthylation, la source de carbone radioactif provenant du cyclotron est du gaz carbonique marqué au carbone 11 qui va d'abord servir à la production de  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ . Un bon automate doit être capable d'utiliser cette quantité de carbone 11 radioactif pour qu'elle soit retrouvée en grande majorité dans le  $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ . Toute autre source de gaz carbonique non radioactif présente dans les lignes de l'automate va également réagir avec

l'hydruure de lithium aluminium dans du THF anhydre puis l'acide iodhydrique pour donner du  $\text{CH}_3\text{I}$  non-marqué, ce qui va abaisser l'activité spécifique du produit final. L'automate doit potentialiser son utilisation de la radioactivité source et diminuer, autant qu'il le peut, les sources de contaminations "froides". Les premières expériences de production de  $\text{CH}_3\text{I}$  avec remplissage de la cible ont permis de mettre en évidence une entrée importante de  $\text{CO}_2$ . Le remplissage de la cible a conduit à une augmentation de 58% de la production de  $\text{CH}_3\text{I}$ . Néanmoins, après avoir identifié l'origine du  $\text{CO}_2$  non radioactif, nous n'avons pas trouvé de solution technique pour la réduire.

L'automate de méthylation dispose d'un lavage automatisé, évitant l'intervention humaine entre les radiosynthèses, source d'irradiation importante. Nous avons voulu déterminer en synthèse "froide", l'influence de l'éthanol comme solvant de lavage sur la production de  $\text{CH}_3\text{I}$ . Nous avons détecté, par HPLC, la présence d'iodure d'éthyle parmi les produits de l'automate de méthylation, signifiant que des résidus d'éthanol avaient contribué à la réaction de méthylation. Nous avons donc décidé de ne plus utiliser l'éthanol mais l'acétonitrile. Au fur et à mesure des synthèses, la production d'iodure d'éthyle a été totalement réduite et la production de  $\text{CH}_3\text{I}$  a été augmentée de 54%. L'utilisation d'acétonitrile a probablement contribué à une meilleure activité spécifique mais nous n'avons pas effectué les expériences radioactives complémentaires nous permettant de nous en rendre compte quantitativement.

Le trifluorométhanesulfonate de méthyle ou  $\text{CH}_3\text{OTf}$  est une espèce hautement réactive (Jewett et Douglas, 1992) qu'il est possible de produire avec l'automate de méthylation. Nos premières expériences d'optimisations se sont focalisées sur la production de cette espèce. Elles ont été réalisées dans des conditions de radioactivité assez faibles (tirs de cyclotron de l'ordre de 6  $\mu\text{A}$ , en quelques minutes). La conversion de 80% du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  en  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  nécessite une température de l'ordre de 180 à 220°C et un débit de gaz de 30  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Mock et al., 1999). Cependant, ce flux élevé ne permet pas au  $\text{CH}_3\text{OTf}$  de diffuser de manière optimale dans le solvant tapissant la boucle de synthèse. Nous avons donc choisi un flux plus faible de 12  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Dans ces conditions, nos résultats montrent que la conversion du  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$  en  $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$  est complète.



## 2. La boucle de synthèse (AutoLoop™, Bioscan®)

### a. Optimisations

De manière surprenante, les premières synthèses du  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  ont révélé une forte production (70%) de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ . Ce composé est issu de la décomposition du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$ , composé très réactif. En effet, ce dernier est très sensible à l'humidité et des traces d'eau peuvent le désactiver. Nous avons estimé qu'il pouvait exister des traces d'eau résiduelle dans les lignes jusqu'à la boucle, qui conduisaient à la formation de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  plutôt que de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ . En effet, le lavage automatisé de la boucle de synthèse utilise notamment de l'eau distillée. Nous avons donc étudié l'influence de l'humidité résiduelle dans le milieu de synthèse en comparant les rapports des quantités de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  et de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  obtenues en fin de synthèse. En effet, plus la quantité de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  est importante, plus le  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  s'est décomposé et ne réagi pas pour former le  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ . Cette logique s'appuie sur l'hypothèse que le  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ , formé avant d'atteindre la boucle de synthèse, est porté par le flux de gaz jusqu'à la boucle. La quantité totale de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$  formée dans le système de synthèse peut donc être déterminée. Nos résultats montrent que sécher les lignes des automates, par un flux d'azote à 1 bar pendant 1 heure, permet d'augmenter significativement la production de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  par rapport à celle de  $^{11}\text{CH}_3\text{OH}$ . Ainsi, toutes les synthèses suivantes ont été réalisées avec cette étape de séchage.

Des travaux récents ont évalués l'influence de solvants sur les réactions en boucle (Iwata et al., 2001). En nous inspirant de cette étude, nous avons testé différents solvants dans nos conditions de synthèse. L'acétone, utilisé pour les radiosynthèses de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  en réacteur par Solbach et al. (2005) s'est révélé être trop volatil pour une utilisation en boucle. L'absence de réaction de marquage lors de l'utilisation de  $\text{DMF}_{\text{anh}}$  ou  $\text{DMSO}_{\text{anh}}$  peut s'expliquer par une désactivation du  $^{11}\text{CH}_3\text{OTf}$  (Mock et al., 2007). Dans nos conditions expérimentales, la cyclohexanone (CHO) et la butylméthylcétone (BMK) qui ont donné de meilleures productions de  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  que le solvant de référence (méthyléthylcétone, MEK, utilisé par Wilson et al., 2000). Nous n'avons pas trouvé d'explications à ces différences de productions par des méthodologies similaires en boucle.

La quantité de précurseur injecté dans la boucle doit être suffisante pour produire de bons rendements radiochimiques. Cependant, elle ne doit pas être en excès: (1) pour ne pas

risquer de perturber la séparation du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB par HPLC, et (2) pour permettre de limiter les dépenses en précurseur. Plusieurs quantités ont été testées, dans 80  $\mu\text{L}$  du solvant de référence utilisé par Wilson en boucle (méthyléthylcétone, MEK). Dans nos conditions expérimentales, la quantité offrant le meilleur compromis est de 1 mg.

Enfin, le temps de réaction de 1 min dans la boucle a donné les meilleures production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB.

### ***b. Synthèses en routine***

Une fois ces différents paramètres optimisés (1 heure de séchage, 1 mg de précurseur dans 80  $\mu\text{L}$  de CHO, 1 min de réaction en boucle) en conditions de faible radioactivité, nous les avons transposées aux conditions de routine (40  $\mu\text{A}$  obtenus en 1 heure de tir sur la cible du cyclotron).

La forte réactivité du [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>OTf permet un radiomarquage direct au niveau de l'amine de l'aniline du précurseur. Néanmoins, cette *N*-méthylation peut être accompagnée d'une *O*-méthylation au niveau de la fonction phénol qui n'est pas protégée. Cependant, nos résultats ont montré que la formation du *O*-[ $^{11}\text{C}$ ]méthylbenzothiazole est très faible (<1%) et qu'elle peut être écartée par purification HPLC.

Dans des conditions de routine, nous avons obtenus des activités spécifiques de 20 à 60 GBq. $\mu\text{mol}^{-1}$  et des rendements radiochimiques de 13 à 15 % (non corrigés de la décroissance, basés sur la production de 40 GBq de  $^{11}\text{CO}_2$  par le cyclotron). Ces valeurs sont comparables aux valeurs rapportées par Wilson et al. (2004) avec un système de synthèse en boucle (non-automatisé). Par contre, nous obtenons une production de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (4986 MBq) bien inférieure à celle rapportée par Solbach et al. (2005) en synthèse manuelle dans un réacteur classique (8500 MBq). Il convient cependant de relever trois inconvénients à leur système: (1) une quantité plus importante de précurseur est engagée, (2) une exposition aux radiations plus importantes et (3) une durée de radiosynthèse plus longue. D'autre part, les productions de [ $^{11}\text{C}$ ]PIB avec notre système sont suffisantes pour envisager des examens d'imagerie TEP en clinique et préclinique. Et enfin, l'heure de séchage, constituant une étape supplémentaire dans la préparation d'une radiosynthèse, correspond à la durée de tir cyclotron nécessaire (40  $\mu\text{A}$  en 1 h) pour des examens en routine.

## F. Conclusion

Ces travaux ont démontré que la synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB à partir du système de synthèse automatisé Bioscan® est possible. Le système de synthèse entièrement automatisé permet d'effectuer une synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB simple et reproductible. Une personne ayant peu de notions en radiochimie peut réaliser lui-même ses radiosynthèses, après une courte formation sur l'utilisation des automates. L'approche que nous avons développée permet de synthétiser ce radiotraceur TEP plusieurs fois par jour si l'activité préclinique et/ou clinique le nécessite. A cet égard, des tests sont toujours en cours pour évaluer la fiabilité des deux automates lors de synthèses répétées.

*Ce travail a fait l'objet d'une publication : "Verdurand M, Bort G, Tadino V, Bonnefoi F, Le Bars D, Zimmer L (2008). An automated radiosynthesis of the Pittsburgh compound B ( $^{11}\text{C}$ ]PIB) using a commercial synthesizer. Nucl Med Comm 29(10):920-6".*

# Bibliographie

1. Agdeppa ED, Kepe V, Liu J, Flores-Torres S, Satyamurthy N, Petric A, Cole GM, Small GW, Huang SC, Barrio JR (2001). Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:RC189.
2. Agdeppa ED, Kepe V, Liu J, Small GW, Huang SC, Petric A, Satyamurthy N, Barrio JR (2003a). 2-Dialkylamino-6-acylmalononitrile substituted naphthalenes (DDNP analogs): novel diagnostic and therapeutic tools in Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol* 5:404-17.
3. Agdeppa ED, Kepe V, Petric A, Satyamurthy N, Liu J, Huang SC, Small GW, Cole GM, Barrio JR (2003b). *In vitro* detection of (S)-naproxen and ibuprofen binding to plaques in the Alzheimer's brain using the positron emission tomography molecular imaging probe 2-(1-{6-(2-[F-18 fluoroethyl) (methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene) malononitrile. *Neurosci* 117:723-30.
4. Archer HA, Edison P, Brooks DJ, Barnes J, Frost C, Yeatman T, Fox NC, Rossor MN (2006). Amyloid load and cerebral atrophy in Alzheimer's disease: an <sup>11</sup>C-PIB positron emission tomography study. *Ann Neurol* 60:145-7.
5. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1:103-16.
6. Bacskai BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hyman BT (2002). Imaging amyloid-beta deposits *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1035-41.
7. Barrio JR, Kepe V, Satyamurthy N, Huang S-C, Small GW (2006). Brain pathology and neuronal losses in the living brain of Alzheimer's patients. *Int Congress Series* 1290:150-155.
8. Cai L, Chin FT, Pike VW, Toyama H, Liow JS, Zoghbi SS, Modell K, Briard E, Shetty HU, Sinclair K, Donohue S, Tipre D, Kung MP, Dagostin C, Widdowson DA, Green M, Gao W, Herman MM, Ichise M, Innis RB (2004). Synthesis and evaluation of two 18F-labeled 6-iodo-2-(4'-N,N-dimethylamino) phenylimidazo[1,2-a]pyridine derivatives as prospective radioligands for beta-amyloid in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 47:2208-18.
9. Cai LS, Ye D, Liow JS, Hong J, Cohen RM, Pike VW, Innis RB (2006). PET imaging of transgenic mice TG2576 using the beta-amyloid radioligand, [C-11]PIB. *Neuroimage* 31:T44-T186.
10. Cai L, Liow JS, Zoghbi SS, Cuevas J, Baetas C, Hong J, Shetty HU, Seneca NM, Brown AK, Gladding R, Temme SS, Herman MM, Innis RB, Pike VW (2008). Synthesis and evaluation of N-methyl and S-methyl <sup>11</sup>C-labeled 6-methylthio-2-(4'-N,N-dimethylamino)phenylimidazo[1,2-a]pyridines as radioligands for imaging beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 51:148-58.
11. Costes N (2007). Neurotransmission sérotoninergique 5-HT<sub>1A</sub>: approche méthodologique de la mesure *in vivo* par le [<sup>18</sup>F]MPPF en tomographie par émission de positons. Thèse n°158-2007.

12. Crouzel C, Langström B, Pike VW, Coenen HH (1987). Recommendations for a practical production of [ $^{11}\text{C}$ ]methyl iodide. *Int Appl Radiat Isot* 38:601-4.
13. Eckelman WC, Mathis CA (2006). Targeting proteins *in vivo*: *in vitro* guidelines. *Nucl Med Biol* 33:161-4.
14. Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, Hotton G, Cutler D, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ (2007). Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [ $^{11}\text{C}$ ]PIB and [ $^{18}\text{F}$ ]FDG PET study. *Neurology* 68:501-8.
15. Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Langström B, Nordberg A (2006). Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 129:2856-66.
16. Forsberg A, Engler H, Almkvist O, Blomquist G, Hagman G, Wall A, Ringheim A, Langstrom B, Nordberg A (2007). PET imaging of amyloid deposition in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* (sous presse).
17. Furumoto S, Okamura N, Ishikawa Y, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Maruyama M, Akatsu H, Suemoto T, Yamamoto T, Arai H, Sawada T, Iwata R, Yanai K, Kudo Y (2005). [ $^{11}\text{C}$ ]BF227: A new  $^{11}\text{C}$ -labeled 2-ethenylbenzoxazole derivative for amyloid- $\beta$  plaques imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:S161.
18. Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y (2007). Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Curr Top Med Chem* 7:1773-89.
19. Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004). Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925-31.
20. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001). Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550-2.
21. Jacobs RE, Cherry SR (2001). Complementary imaging techniques: high resolution PET and MRI. *Current Opin Neurobiol* 11:621-9.
22. Jewett D, Douglas M (1992). A simple synthesis of [ $^{11}\text{C}$ ]methyl triflate. *Appl Radiat Isotop* 43:1383-5.
23. Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, Bruck A, Oikonen V, Kailajarvi M, Scheinin M, Viitanen M, Parkkola R, Rinne JO (2006). Voxel-based analysis of PET amyloid ligand [ $^{11}\text{C}$ ]PIB uptake in Alzheimer disease. *Neurology* 67:1575-80.
24. Klunk WE, Debnath ML, Pettegrew JW (1995). Chrysamine-G binding to Alzheimer and control brain: autopsy study of a new amyloid probe. *Neurobiol Aging* 16:541-8.
25. Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang YM, Hyman BT (2002). Imaging A beta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:797-805.
26. Klunk WE, Wang Y, Huang GF, Debnath ML, Holt DP, Shao L, Hamilton RL, Ikonomic MD, DeKosky ST, Mathis CA (2003). The binding of 2-(4'-methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J Neurosci* 23:2086-92.
27. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang YM, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55:306-19.
28. Klunk WE, Lopresti BJ, Ikonomic MD, Lefterov IM, Koldamova RP, Abrahamson EE, Debnath ML, Holt DP, Huang GF, Shao L, DeKosky ST, Price JC, Mathis CA (2005).

Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci* 25:10598-606.

29. Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H (2007). 2-[2-(2-Dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-fluoroethoxy]benzoxazole (BF227): A novel PET imaging agent for *in vivo* detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48:553-61.
30. Kumar P, Zheng WZ, McQuarrie SA, Jhamandas JH, Wiebe L (2005). F-18-FESB: synthesis and automated radiofluorination of a novel F-18-labeled pet tracer for beta-amyloid plaques. *J Label Compd Radiopharm* 48:983-96.
31. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Zhang B, Skovronsky D, Trojanowski JQ, Lee VMY, Kung H F (2002). IMPY: an improved thioflavin-T derivative for *in vivo* labeling of beta-amyloid plaques. *Brain Res* 956:202-10.
32. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Skovronsky D, Kung HF (2004a). Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 1025:98-105.
33. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Cross AJ, Maier DL, Kung HF (2004b). Characterization of IMPY as a potential imaging agent for beta-amyloid plaques in double transgenic PSAPP mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:1136-45.
34. Kuo YM, Emmerling MR, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE (1997). Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* 237:188-91.
35. Kuo YM, Webster S, Emmerling MR, De Lima N, Roher AE (1998). Irreversible dimerization/tetramerization and post-translational modifications inhibit proteolytic degradation of A beta peptides of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1406:291-8.
36. Lemaire C, Plénevaux A, Aerts J, Del Fiore G, Brihaye C, Le Bars D, Comar D, Luxen A (1999). Solid phase extraction – an alternative to the use of rotary evaporators for solvent removal in the rapid formulation of PET radiopharmaceuticals. *J Label Compd Radiopharm* 42:63-75.
37. LeVine H, 3<sup>rd</sup> (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2:404-10.
38. Li Y, Rinne JO, Mosconi L, Pirraglia E, Rusinek H, Desanti S, Kemppainen N, Nagren K, Kim BC, Tsui W, de Leon MJ (2008). Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (sous presse, consultable en ligne).
39. Liao L, Cheng D, Wang J, Duong DM, Losik TG, Gearing M, Rees HD, Lah JJ, Levey AI, Peng J (2004). Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection. *J Biol Chem* 279:37061-8.
40. Liu J, Kepe V, Zabjek A, Petric A, Padgett HC, Satyamurthy N, Barrio JR (2007). High-yield, automated radiosynthesis of 2-(1-{6-[(2-[<sup>18</sup>F] fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malononitrile ([<sup>18</sup>F]FDDNP) ready for animal or human administration. *Mol Imaging Biol* 9:6-16.
41. Lockhart A, Ye L, Judd DB, Merritt AT, Lowe PN, Morgenstern JL, Hong G, Gee AD, Brown J (2004). Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem* 280:7677-84.
42. Lopresti BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hoge JA, Ziolkowski SK, Lu XL, Meltzer CC, Schimmel K, Tsopelas ND, DeKosky ST, Price JC (2005). Simplified quantification of Pittsburgh

- compound B amyloid imaging PET studies: A comparative analysis. *J Nucl Med* 46:1959-72.
43. Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T (2007a). Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* 27:10957-68.
  44. Makin OS, Serpell LC (2002). Examining the structure of the mature amyloid fibril. *Biochem Soc Trans* 30:521-5.
  45. Mason NS, Mathis CA (2003). Positron emission tomography radiochemistry. *Neuroimaging Clin N Am* 13:671-87.
  46. Mathis CA, Wang YM, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE (2003). Synthesis and evaluation of C-11-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* 46:2740-54.
  47. Mathis CA, Wang Y, Klunk WE (2004). Imaging beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the aging human brain. *Curr Pharm Des* 10:1469-92.
  48. Mintun MA, Larossa GN, Sheline YI, Dence CS, Lee SY, Mach RH, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC (2006). [<sup>11</sup>C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 67:446-452.
  49. Mock BH, Mulholland GK, Vavrek MT (1999). Convenient gas phase bromination of [<sup>11</sup>C]methane and production of [<sup>11</sup>C]methyl triflate. *Nucl Med Biol* 26:467-71.
  50. Mock BH, Zheng QH, Degradó TR (2007). Avoid DMF when labeling with 11C-methyl triflate. *J Label Compd Radiopharm* 50:S197.
  51. Newberg AB, Wintering NA, Plossl K, Hochold J, Stabin MG, Watson M, Skovronsky D, Clark CM, Kung MP, Kung HF (2006). Safety, biodistribution, and dosimetry of I-123-IMPY: a novel amyloid plaque-imaging agent for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 47:748-54.
  52. Okamura N, Suemoto T, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Sasaki H, Yanai K, Staufenbiel M, Kudo Y, Sawada T (2004a). A novel imaging probe for *in vivo* detection of neuritic and diffuse amyloid plaques in the brain. *J Mol Neurosci* 24:247-55.
  53. Okamura N, Suemoto T, Shimadzu H, Suzuki M, Shiomitsu T, Akatsu H, Yamamoto T, Staufenbiel M, Yanai K, Arai H, Sasaki H, Kudo Y, Sawada T (2004b). Styrylbenzoxazole derivatives for *in vivo* imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci* 24:2535-41.
  54. Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y (2005). Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for *in vivo* imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:10857-62.
  55. Ono M, Wilson A, Nobrega J, Westaway D, Verhoeff P, Zhuang ZP, Kung MP, Kung HF (2003). C-11-labeled stilbene derivatives as A beta-aggregate-specific PET imaging agents for Alzheimer's disease. *Nucl Med Biol* 30:565-71.
  56. Pardridge WM (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2:3-14.
  57. Price JC, Klunk WE, Lopresti BJ, Lu X, Hoge JA, Ziolkowski SK, Holt DP, Meltzer CC, DeKosky ST, Mathis CA (2005). Kinetic modeling of amyloid binding in humans using PET imaging and Pittsburgh Compound-B. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1528-47.

58. Rowe CC, Ackerman U, Browne W, Mulligan R, Pike KL, O'Keefe G, Tochon-Danguy H, Chan G, Berlangieri SU, Jones G, Dickinson-Rowe KL, Kung HP, Zhang W, Kung MP, Skovronsky D, Dyrks T, Holl G, Krause S, Friebe M, Lehman L, Lindemann S, Dinkelborg LM, Masters CL, Villemagne VL (2008). Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with  $^{18}\text{F}$ -BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol* 7:129-35.
59. Selkoe DJ (2000). The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. *JAMA* 283:1615-17.
60. Serpell LC (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* 1502:16-30.
61. Shimadzu H, Suemoto T, Suzuki M, Shiomitsu T, Okamura N, Kudo Y, Sawada, T (2004). Novel probes for imaging amyloid- $\beta$ : F-18 and C-11 labeling of 2-(4-aminostyryl)benzoxazole derivatives. *J Label Compd Radiopharm* 47:181-90.
62. Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Read S, Satyamurthy N, Petric A, Huang SC, Barrio JR (2002). Localization of neurofibrillary tangles and beta amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 10:24-35.
63. Silverman DH, Phelps ME (2001). Application of positron emission tomography for evaluation of metabolism and blood flow in human brain: normal development, aging, dementia, and stroke. *Mol Genet Metab* 74:128-38.
64. Skovronsky DM, Zhang B, Kung MP, Kung HF, Trojanowski JQ, Lee VM (2000). *In vivo* detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7609-14.
65. Small GW, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Bookheimer SY, Miller KJ, Lavretsky H, Burggren AC, Cole GM, Vinters HV, Thompson PM, Huang SC, Satyamurthy N, Phelps ME, Barrio JR (2006). PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 355:2652-63.
66. Small GW, Bookheimer SY, Thompson PM, Cole GM, Huang S-C, Kepe V, Barrio JR (2008). Current and future uses of neuroimaging for cognitively impaired patients. *Lancet Neurol* 7:161-72.
67. Solbach C, Uebele M, Reischl G, Machulla HJ (2005). Efficient radiosynthesis of carbon-11 labelled uncharged Thioflavin T derivatives using [ $^{11}\text{C}$ ]methyl triflate for  $\beta$ -amyloid imaging in Alzheimer's disease with PET. *Appl Radiat Isotop* 62:591-5.
68. Toyama H, Ye D, Ichise M, Liow JS, Cai L, Jacobowitz D, Musachio JL, Hong J, Crescenzo M, Tipre D, Lu JQ, Zoghbi S, Vines DC, Seidel J, Katada K, Green MV, Pike VW, Cohen RM, Innis RB (2005). PET imaging of brain with the beta-amyloid probe, [ $^{11}\text{C}$ ]6-OH-BTA-1, in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:593-600.
69. Van Groen T, Kiliaan AJ, Kadish I (2006). Deposition of mouse amyloid beta in human APP/PS1 double and single AD model transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23:653-62.
70. Vera DR, Eckelman WC (2001). Receptor 1980 and Receptor 2000: twenty years of progress in receptor-binding radiotracers. *Nucl Med Biol* 28:475-6.
71. Wang J, Maurer L (2005). Positron emission tomography: applications in drug discovery and drug development. *Curr Top Med Chem* 5:1053-75.
72. Waterhouse RN (2003). Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol* 5:376-89.
73. Wilson AA, Garcia A, Jin L, Houle S (2000). Radiotracer synthesis from [ $^{11}\text{C}$ ]iodomethane: a remarkably simple captive solvent method. *Nucl Med Biol* 27:529-32



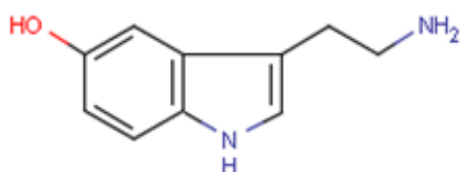
74. Wilson AA, Garcia A, Chestakova A, Kung H, Houle S (2004). A rapid one-step radiosynthesis of the  $\beta$ -amyloid imaging radiotracer *N*-methyl- $^{11}\text{C}$ 2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ( $^{11}\text{C}$ ]-6-OH-BTA-1). *J Label Compd Radiopharm* 47:679-82.
75. Zeng F, Southerland JA, Voll RJ, Votaw JR, Williams L, Ciliax BJ, Levey AI, Goodman MM (2006). Synthesis and evaluation of two  $^{18}\text{F}$ -labeled imidazo[1,2-a]pyridine analogues as potential agents for imaging beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3015-8.
76. Zhang W, Oya S, Kung MP, Hou C, Maier DL, Kung HF (2005). F-18 Stilbenes as PET imaging agents for detecting beta-amyloid plaques in the brain. *J Med Chem* 48:5980-8.
77. Zheng MQ, Yin DZ, Zhang L, Lei B, Cheng DF, Cai HC, Han YJ, Wu MX, Zhang H, Wang J (2008). Biological characters of  $^{18}\text{F}$ ]O-FEt-PIB in a rat model of Alzheimer's disease using micro-PET imaging. *Acta Pharmacol Sin* 29:548-54.
78. Zhuang ZP, Kung MP, Hou C, Skovronsky DM, Gur TL, Plossl K, Trojanowski JQ, Lee VMY, Kung HF (2001). Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J Med Chem* 44:1905-14.
79. Zhuang ZP, Kung MP, Wilson A, Lee CW, Plossl K, Hou C, Holtzman DM, Kung HF (2003). Structure-activity relationship of imidazo 1,2-alpha pyridines as ligands for detecting beta-amyloid plaques in the brain. *J Med Chem* 46:237-43.
80. Ziolkowski SK, Weissfeld LA, Klunk WE, Mathis CA, Hoge JA, Lopresti BJ, DeKosky ST, Price JC (2006). Evaluation of voxel-based methods for the statistical analysis of PIB PET amyloid imaging studies in Alzheimer's disease. *Neuroimage* 33:94-102.

# Chapitre 3 - Imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la MA

## I. Rappels bibliographiques

### A. La neurotransmission sérotoninergique

#### 1. La sérotonine



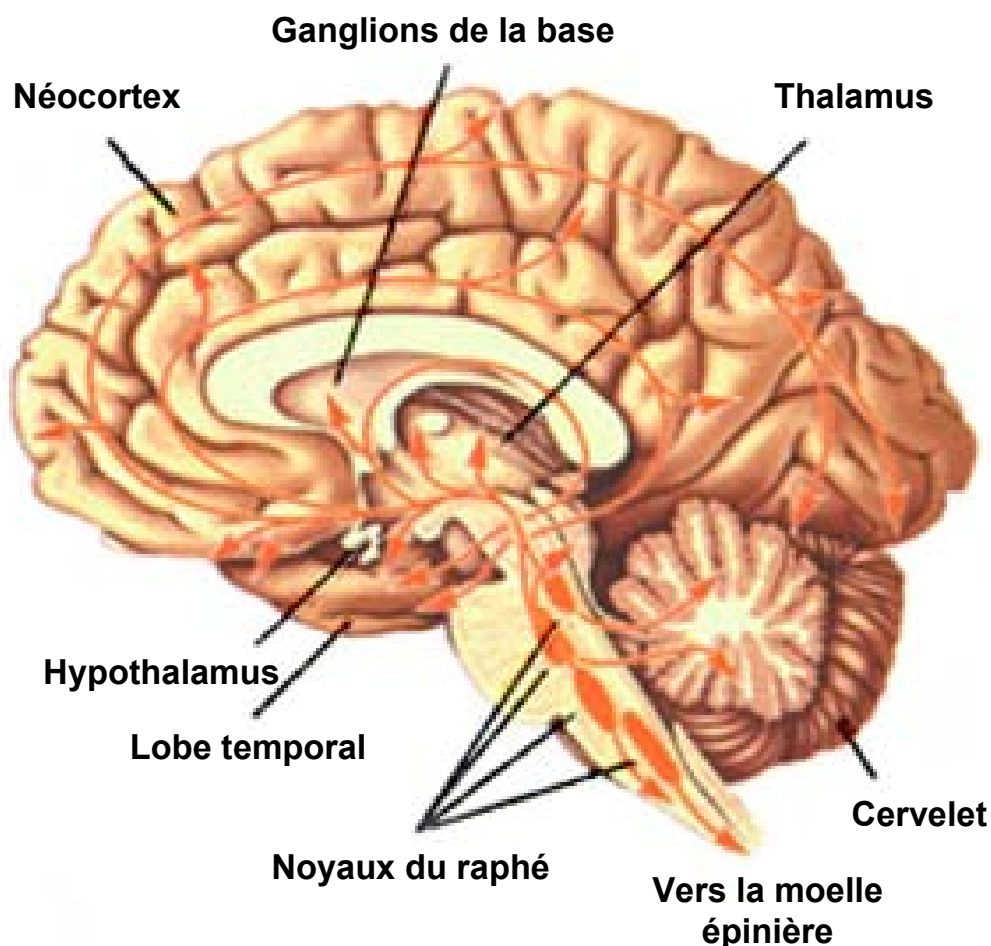
**Figure 29.** Structure de la 5-hydroxytryptamine ou sérotonine ou 5-HT.

La sérotonine est une amine biogène (**Fig. 29**) présente chez une grande variété d'organismes vivants allant des vers (Umbriaco et al., 1990) à l'homme (Hen, 1992). Elle est majoritairement (98%) produite au niveau périphérique par les cellules entérochromaffines de la paroi intestinale pour être ensuite stockée au niveau des plaquettes sanguines. Ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce sont les noyaux du raphé qui la produisent au niveau du système nerveux central (SNC) où elle est largement répandue et agit comme neurotransmetteur produisant ses effets via un grand nombre de récepteurs spécifiques. Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la thermorégulation (Feldberg et Meyers, 1964), le sommeil (Jouvet, 1967), l'agressivité (Sheard, 1969), la prise alimentaire (Lucki, 1992), le développement cérébral (Gaspar et al., 2003; Lauder et Krebs, 1978; Levitt et al., 1997), le contrôle de la nociception (Le Bars et Villanueva, 1988) ainsi que dans la régulation d'un certains nombre de comportements tels que la prise alimentaire (Leibowitz, 1990) et le comportement sexuel (Meston et Gorzalka,

1992). D'autre part, des dysfonctionnements du système sérotoninergique sont impliqués dans de nombreux troubles comme l'anxiété (Gross et al., 2002), la dépression (voir Lanfumey et Hamon, 2004 pour revue), la schizophrénie (Iqbal et Van Praag, 1995), l'autisme (Scott et Deneris, 2005) et dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, tel que nous le développerons ultérieurement (Buhot et al., 2000; Meltzer et al., 1998).

## 2. L'anatomie du réseau sérotoninergique cérébral

Le système sérotoninergique cérébral est centralisé au niveau de ses corps cellulaires dans la région du raphé, au niveau de la zone médiane du bulbe mésencéphale, puis "irradie" de ses projections dans toutes les régions du cerveau. Cette anatomie est particulièrement favorable au rôle régulateur du système (Fig. 30).



**Figure 30.** Anatomie du système sérotoninergique cérébral chez l'homme (d'après "[http://www.psychanalyste.ca/app\\_naturopathie.html](http://www.psychanalyste.ca/app_naturopathie.html)").

### **a. Les corps cellulaires**

La distribution régionale des neurones sérotoninergiques a été initialement étudiée par Dahlström et Fuxe (1964) qui ont décrit un système dont les corps cellulaires sont présents en grande partie dans les noyaux du raphé et la formation réticulée, et qui sont rassemblés en 9 groupes (B1 à B9). Les groupes B1 à B5 contiennent un nombre moins important de corps cellulaires sérotoninergiques que les groupes suivants. Les groupes B6 et B7 (le plus important) forment le noyau du raphé dorsal (NRD). Le groupe B8 représente le noyau du raphé médian (NRM) et le groupe B9 forme son extension latérale mais ne fait pas partie du NRM. Le NRD possède un diamètre de 2 mm<sup>3</sup> et contient 50% des neurones sérotoninergiques du SNC du rat (Descarries et al., 1982), 50 à 60% des neurones 5-HT chez l'humain (Baker et al., 1990) et 40% chez le chat (Wiklund et Björklund, 1980). Il est important de noter que tous les neurones du raphé ne sont pas sérotoninergiques, 50 à 60% sont non-sérotoninergiques (Zhou et Zhang, 1986).

### **b. Les projections**

Bien qu'il n'y ait qu'environ 15200 cellules sérotoninergiques dans le cerveau du rat (Jacobs et Azmitia, 1992), 33000 cellules 5-HT dans le cerveau du chat (Wiklund et al., 1981), et 288000 cellules 5-HT dans le cerveau humain (Törk, 1990), elles permettent l'innervation de la quasi-totalité des aires cérébrales. Deux voies de projections sérotoninergiques peuvent être distinguées. Les voies descendantes prennent naissance dans la partie caudale des groupes nucléaires et projettent vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Les voies ascendantes vont innervier la quasi-totalité du cerveau. Les fibres originaires du NRM innervent fortement l'hippocampe, le septum, l'hypothalamus, le cortex cingulaire, le cortex occipital et l'amygdale. Les fibres originaires du NRD se projettent vers le locus coeruleus, la substance noire, le striatum, le noyau accumbens, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale, le cortex entorhinal, frontal et l'hippocampe (Pineyro et Blier, 1999). Les plus fortes densités de projections sérotoninergiques sont retrouvées dans l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus et le tubercule olfactif (Léger et al., 2001).

D'autre part, l'existence de terminaisons sérotoninergiques dans le NRD de chats et de rats a été rapporté à plusieurs reprises (Aghajanian et Vandermaelen, 1982; Descarries et al., 1982). Ces terminaisons montraient peu de spécialisations synaptiques (Chazal et Ralston,

1987) et contactaient des neurones non-sérotoninergiques (Descarries et al., 1982). L'analyse ultrastructurale dans le cortex et l'hippocampe de rat, a montré que la majorité des varicosités n'est pas associée à une spécialisation synaptique (Descarries et Mechawar, 2000). Dans l'hippocampe, et notamment la région CA3 et le gyrus denté, la proportion des varicosités sérotoninergiques associées à des jonctions synaptiques n'est que de 18 à 33% (Oleskevich et al., 1991). Ainsi, l'innervation du cortex et de l'hippocampe serait principalement non-jonctionnelle. Ces observations, conjuguée à la large distribution cérébrale des terminaisons neuronales, confère au système sérotoninergique une capacité importante d'interaction avec les autres systèmes et lui permet de jouer pleinement son rôle de neuromodulateur.

### 3. Les récepteurs sérotoninergiques

Entre 1987 et 1992, la plupart des récepteurs de la sérotonine ont été clonés, dont au moins 14 types distincts chez les mammifères (Hoyer et al., 1994, 2002). Ils ont été subdivisés en 7 classes (5-HT<sub>1</sub> à 5-HT<sub>7</sub>) selon leur homologie de séquence et de structure, ainsi que selon leur mécanisme effecteur préférentiel. On compte 4 sous-types:

- les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> couplés aux protéines G<sub>i/o</sub> inhibant l'adénylate-cyclase
- les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> couplés aux protéines G<sub>q</sub> activant la phospholipase C
- les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> formant des canaux ioniques
- les récepteurs 5-HT<sub>4/6/7</sub> couplés aux protéines G<sub>s</sub> activant l'adénylate cyclase.

Le couplage des récepteurs 5-HT<sub>5</sub> reste encore incertain (Hoyer et al., 1994, 2002). A l'exception des récepteurs 5-HT<sub>3</sub> qui sont des récepteurs canaux, tous les récepteurs sérotoninergiques appartiennent à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs).

Les récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines G<sub>i/o</sub> sont les 5-HT<sub>1A</sub> (Fargin et al., 1988), auxquels nous allons nous intéresser ultérieurement, les 5-HT<sub>1B</sub> (Adham et al., 1992), les 5-HT<sub>1D</sub> (Hamblin et Metcalf, 1991), les 5-HT<sub>1E</sub> (Zgombick et al., 1992), les 5-HT<sub>1F</sub> (Adham et al., 1993) et de manière moins précise les 5-HT<sub>5(A et B)</sub> (Matthes et al., 1993). L'activation de cette classe de récepteur conduit à l'inhibition de l'adénylate cyclase et à la baisse de la production d'AMPc (pour adénosine monophosphate cyclique). Des canaux

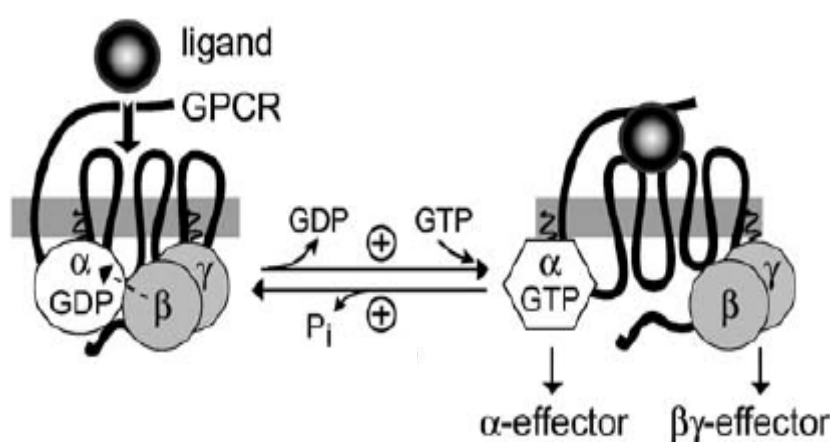
potassiques peuvent être activés et des canaux calciques inhibés (voir [Lanfumey et Hamon, 2000](#) pour revue).

Les récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines  $G_{q/11}$  sont les 5-HT<sub>2A</sub> ([Branchek et al., 1990](#)), 5-HT<sub>2B</sub> ([Kursar et al., 1992](#)) et 5-HT<sub>2C</sub> ([Julius et al., 1988](#)). L'activation de cette classe de récepteurs provoque l'hydrolyse de phosphoinositides membranaires formant le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3), qui vont ensuite agir comme messagers seconds intracellulaires pour activer la protéine kinase C (PKC) par exemple, et élever la concentration de calcium intracellulaire. D'autre part, les protéines  $G_{q/11}$  ont la capacité de réguler des changements de structure de la cellule, notamment par l'activation de la "voie de signalisation Rho", qui induit la formation de fibres de stress et d'adhésions focales.

Les récepteurs sérotoninergiques couplés aux protéines  $G_s$  sont les 5-HT<sub>4</sub> ([Gerald et al., 1995](#)), 5-HT<sub>6</sub> ([Monsma et al., 1993](#); [Plassat et al., 1993](#); [Ruat et al., 1993a](#)), auxquels nous allons nous intéresser ultérieurement, et les 5-HT<sub>7</sub> ([Bard et al., 1993](#); [Lovenberg et al., 1993](#); [Ruat et al., 1993b](#)). L'activation des récepteurs couplés aux protéines  $G_s$  stimule l'adénylate cyclase qui convertit l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc. L'AMPc est un messager intracellulaire qui va agir sur différentes cibles effectrices, notamment sur les canaux ioniques et la PKA (protéine kinase AMPc dépendante), ce qui va permettre de réguler, entre autres, l'entrée d'ions calcium dans la cellule et faciliter l'excitabilité de sa membrane. La PKA a également la capacité de stimuler des facteurs de transcription comme CREB (cAMP response element binding protein) qui modifient l'expression de gènes. Il a été montré assez récemment que l'AMPc a la possibilité de se lier à Epac (exchange proteins directly activated by cAMP) pour activer notamment les Rap et Ras GTPases ([Holz et al., 2006](#)).

L'activation des récepteurs couplés aux protéines G que nous venons de décrire, s'effectue selon un mécanisme bien décrit que nous présentons rapidement ci-après. La sérotonine libérée par le neurone sérotoninergique va pouvoir fixer un de ses multiples récepteurs. Celui-ci est couplé, au niveau d'une boucle intracellulaire en C-terminus, à un complexe protéique composé de 3 unités hétérogènes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) dont l'une ( $\alpha$ ), a la capacité de lier le GTP (pour guanosine triphosphate). Ce complexe protéique forme les protéines G (**Fig. 31**). A l'état inactif, le récepteur est couplé à sa protéine G dont la sous-unité  $\alpha$  lie le GDP (guanosine diphosphate). Lorsqu'un agoniste (ligand endogène ou non) vient lier le récepteur

au niveau extracellulaire, un changement de conformation est transmis aux boucles intracellulaires (IL2 et IL3), induisant un remplacement du GDP (libéré) par du GTP (fixé) au niveau du complexe protéique (protéines G) (Johnston et Siderovski, 2007). La liaison du GTP à la sous-unité  $\alpha$  ainsi activée, provoque la dissociation des sous-unités  $\alpha$ -GTP d'une part et  $\beta\gamma$  d'autre part, qui vont pouvoir entraîner et stimuler différents effecteurs enzymatiques à l'intérieur de la cellule. Le processus de signalisation intracellulaire se termine lorsqu'une GTPase hydrolyse le GTP- $\alpha$  en GDP- $\alpha$ , qui va de nouveau pouvoir former un complexe protéique avec  $\beta\gamma$  et ainsi être couplé à un récepteur libre.



**Figure 31.** Schématisation du mode d'action des récepteurs couplés aux protéines G (d'après McCudden et al., 2005).

## B. La neurotransmission sérotoninergique dans la MA

Comme nous l'avons vu précédemment, les lésions caractéristiques de la MA sont constituées par les plaques amyloïdes extracellulaires, les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires et une perte neuronale. En complément de ces lésions, des perturbations des systèmes de neurotransmission ont constamment été rapportées, particulièrement au niveau du système cholinergique (Arendt et al., 1985; Bowen et Davison, 1980; Nagai et al., 1983; Rossor et al., 1982). Bien que ce système soit généralement considéré comme celui le plus atteint dans la MA, les symptômes cognitifs, neurocomportementaux et neuropsychiatriques

(ou BPSD pour "behavioural and psychological symptoms in dementia") associés à la MA ont été liés à d'autres systèmes de neurotransmission ([Assal et Cummings, 2002](#)).

Ainsi, des études en *post-mortem* sur des cerveaux de patients décédés après une MA, ont montré que le système sérotoninergique est particulièrement affecté ([Meltzer et al., 1998](#)). En effet, une perte des neurones synthétisant la sérotonine au niveau des noyaux du raphé médian et dorsal a pu être mise en évidence à plusieurs reprises en *post-mortem* ([Aletrino et al., 1992](#); [Curcio et Kemper, 1984](#); [Halliday et al., 1992](#); [Yamamoto et Hirano, 1985](#); [Zweig et al., 1988](#)). Plus spécifiquement, au niveau rostral et caudal du noyau du raphé dorsal, une diminution du marquage immunohistochimique de la tryptophane hydroxylase (TH), enzyme de synthèse de la 5-HT, a été constatée dans le cerveau de patients décédés après une MA ([Lee et Kowall, 1989](#)). En conséquence, une réduction de la sérotonine tissulaire et de ses métabolites a pu être rapportée ([Reinikainen et al., 1991](#)). Les corps cellulaires sérotoninergiques ne sont pas les seuls à être touchés. Dans les aires corticales de projections des neurones sérotoninergiques, le transporteur de la sérotonine est diminué tout comme la sérotonine tissulaire et ses métabolites, chez un groupe de patients atteints d'une MA à un stade encore léger ([Chen et al., 1996](#); [Cross, 1990](#); [D'amato et al., 1987](#)). Ces derniers résultats suggèrent qu'en plus de la perte des corps cellulaires sérotoninergiques, il existe une perte assez précoce des terminaisons sérotoninergiques chez les patients atteints de la MA.

L'atteinte du système sérotoninergique a été étudiée, en *post-mortem*, au niveau de l'expression de ses récepteurs. Ainsi, l'expression des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> a montré être diminuée ([Cross et al., 1986](#); [Lai et al., 2005](#); [Lorke et al., 2006](#); [Reynolds et al., 1984](#)). Une réduction de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, d'un niveau comparable, a été constatée chez des patients décédés de la MA ([Lorke et al., 2006](#)). Enfin, des études s'intéressant à l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, majoritairement localisés dans les structures limbiques comme l'hippocampe ([Palacios et al., 1990](#)), ont montrées leur réduction ([Bowen et al., 1989](#); [Francis et al., 1993](#); [Middlemiss et al., 1986](#)) ou une absence de modification ([Cross et al., 1986](#); [Sparks, 1989](#)).

Nous avons choisis de nous intéresser plus particulièrement à l'imagerie TEP de deux types de récepteurs sérotoninergiques dont l'expression est affectée dans la MA. (1) Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et (2) les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.





## II. Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et la MA

### A. Contexte

#### 1. La distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>

Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont parmi les récepteurs sérotoninergiques les plus récemment découverts. Ils ont été clonés par RT-PCR (reverse transcriptase couplé à une réaction de polymérisation en chaîne) à partir de striatum de rat (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993a). Ils sont activés par la sérotonine ou un agoniste, stimulent l'adénylate cyclase dans des lignées cellulaires (Unsworth et Molinoff, 1994), dans le striatum de cochon (Schoeffer et Waeber, 1994) et chez un fœtus de souris (Sebben et al., 1994). Une particularité intéressante de ces récepteurs est leur localisation constatée exclusivement dans le SNC (Ruat et al., 1993a). La séquence d'acides aminés chez la souris est identique à 97% à celle chez le rat et présente 89% d'homologie avec celle de l'humain (Hirst et al., 2003). Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>2</sub> présentent une forte homologie de séquence (Setola et Roth, 2003). Les études de Northern Blot (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993a), d'hybridation *in situ* (Ward et al., 1995) et de QRT-PCR (pour "quantitative reverse transcription" et "polymerase chain reaction") (Gérard et al., 1996) ont montré une localisation des ARNm des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> au niveau du striatum, du noyau accumbens, des tubercules olfactifs, du cortex, de l'hippocampe, de l'hypothalamus et de l'amygdale. La plus forte densité d'ARNm a été retrouvée dans le gyrus denté et dans les aires CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe (Ruat et al., 1993a; Ward et al., 1995).

La localisation de la protéine 5-HT<sub>6</sub> a tout d'abord été déterminée par immunohistochimie. La présence de la protéine 5-HT<sub>6</sub> a été rapportée au niveau des tubercules olfactifs, du cortex, du noyau accumbens, du striatum, de l'hippocampe, du cervelet, du thalamus, de la substance noire, de la couche superficielle du colliculus supérieur, dans les noyaux moteurs (trigéminal et facial) et dans l'hypothalamus (Gérard et al., 1997; Hamon et al., 1999; Roberts et al., 2002). Des études autoradiographiques utilisant des traceurs antagonistes sélectifs des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> comme le [<sup>125</sup>I]SB-258585 (Hirst et al.,

2000; Roberts et al., 2002) et le [<sup>3</sup>H]Ro 63-05363 (Boess et al., 1998) ont confirmé cette localisation. Ainsi, la distribution des protéines est comparable à celle des ARNm des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Cependant, on peut noter des différences de niveau d'expression (ARNm et protéine) chez la souris par rapport au rat et à l'humain (Hirst et al., 2003). Les études pharmacologiques de ligands 5-HT<sub>6</sub> seraient donc plus transposables à l'homme, lorsqu'elles sont menées chez le rat plutôt que chez la souris. Bien que peu d'études *post-mortem* chez l'humain soient disponibles, la distribution des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> semble être similaire à celle mise en évidence chez le rat (East et al., 2002; Lorke et al., 2006). Les expériences d'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique ont révélé que les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont présents uniquement sur des neurones (Hamon et al., 1999) et plus précisément sur les dendrites, au niveau de l'hippocampe (Gérard et al., 1997). D'autre part, les couches de cellules pyramidales et granulaires de l'hippocampe ne présentaient aucun marquage protéique, malgré la présence d'ARNm (Ward et al., 1995), suggérant que les récepteurs sont transportés des corps cellulaires de ces couches vers les aires dendritiques. La destruction chimique des neurones sérotoninergiques par la 5,7 DHT (5,7 dihydroxytryptamine) n'a pas modifié, chez le rat, les niveaux d'ARNm des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> suggérant qu'ils sont présents au niveau post-synaptique uniquement, sur des neurones non-sérotoninergiques (Gérard et al., 1996). La lésion chimique de l'axe nigro-strié dopaminergique avec de la 6-hydroxydopamine n'a pas modifié le niveau de fixation d'un traceur antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le [<sup>125</sup>I]SB258585, suggérant que ces récepteurs ne sont pas portés par des neurones dopaminergiques (Roberts et al., 2002). De la même manière, la lésion immunotoxique du système cholinergique avec la 192-IgG-saporin n'a pas modifié la densité des ARNm 5-HT<sub>6</sub>, suggérant qu'ils ne sont pas plus présents sur des neurones cholinergiques (Marcos et al., 2006). En revanche, un double marquage immunohistochimique (5-HT<sub>6</sub>, GABA) a montré que plus de 20% des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont co-localisés sur des neurones GABAergiques de l'hippocampe (Fone et al., 2002).

## **2. Les outils pharmacologiques pour étudier les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>**

Peu de temps après la découverte des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> en 1993, plusieurs équipes ont montré que les antipsychotiques et antidépresseurs tricycliques avaient une forte affinité pour ces récepteurs (Mitchell et Neumaier, 2005; Woolley et al., 2004). A partir de cette constatation, une multitude de ligands 5-HT<sub>6</sub> ont été identifiés et la recherche académique et industrielle

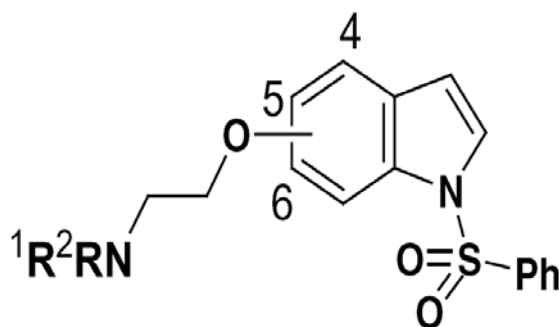
s'est particulièrement développée (Heal et al., 2008). La microdialyse après injection, chez le rat éveillé, d'antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> a montré une augmentation de la concentration extracellulaire en acétylcholine (Riemer et al., 2003; Shirazi-Southall et al., 2002; Sleight et al., 1999) et en glutamate (Dawson et al., 2000, 2001) dans l'hippocampe et le cortex frontal. D'autre part, il est reconnu que les systèmes glutamatergiques et cholinergiques participent au processus cognitifs et sont impliqués dans les perturbations mnésiques (Bartus et al., 1982; Collindridge et al., 1983; Coyle et al., 1983; Greenamyre et Young, 1989). Ainsi, les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, de part leur action stimulante sur les neurotransmissions cholinergique et glutamatergique, ont présenté des propriétés procognitives chez le rat (Meneses, 2001; Rogers et al., 1999, 2000; Woolley et al., 2001, 2003). A notre connaissance (en 2008), huit composés ont montré des propriétés de sélectivité envers les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> et sont entrés dans des essais cliniques. Le WAY-181187 (SAX-187), seul agoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> développé par Wyeth, a été évalué en phase 1 d'essais cliniques pour traiter l'anxiété et les troubles appariés (Cole et al., 2003, 2005a, 2005b). Le LY-483518 (SGS-518), un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> développé par Lilly (Filla et al., 2002; Pineiro-Nunez et al., 2005), a été breveté pour le traitement des troubles cognitifs dans la schizophrénie (Saegis, 2005). Les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> PRX-07034 et BVT-74316, sont tous les deux entrés en phase 1 d'essais cliniques pour le traitement de l'obésité. Le PRX-07034 d'Epix Pharmaceuticals fait également l'objet de recherche dans le traitement des troubles cognitifs dans la MA ou la schizophrénie ("<http://www.epixpharma.com>"). SYN-114, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> de Synosia Therapeutics breveté par Roche, est entré en phase 1 d'essais cliniques pour les troubles cognitifs. Le SB-742457, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> développé par GlaxoSmithKline, est entré en phase 2 d'essais cliniques pour le traitement des perturbations cognitives associées à la MA (Ahmed et al., 2003). Et finalement, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> développé par Wyeth, le SAM-315 est en cours de développement en phase 1 d'essais cliniques pour le traitement de la MA. On peut noter que Memory Pharmaceuticals poursuit ses recherches précliniques sur un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> indiqué dans le traitement des différentes pathologies que nous venons de passer en revue.

L'activité de recherche et de développement de ligands des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> pour la thérapeutique de la MA notamment, rend indispensable de disposer de traceurs sélectifs utilisables en imagerie TEP *in vivo* chez l'homme. Récemment, une équipe d'une firme pharmaceutique a rapporté le radiomarquage au carbone 11 d'un antagoniste des récepteurs 5-

HT<sub>6</sub> ainsi que son évaluation en imagerie TEP préclinique chez le porc (Huiban et al., 2006; Martarello et al., 2005). Son évaluation chez l'homme a été rapportée il y a quelques mois mais du fait de son absence de spécificité entre les récepteurs 5-HT<sub>2</sub> et les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (Martarello et al., 2008), ce radiotraceur a été abandonné.

## B. Objectifs

Mes travaux de thèse sur la thématique des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> s'inscrivent dans le cadre de l'évaluation biologique chez le rat de nouvelles molécules potentiellement traceuses des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Dans cette optique, l'équipe de Zhou et al. (2005) avait caractérisé *in vitro* une nouvelle série de molécules sélectives pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, les 4-(2-aminoéthoxy)-N-(phénylsulfonyl)indoles (**Fig. 32**).



**Figure 32.** Structure de base de la série des molécules sélectives pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, les 4-(2-aminoéthoxy)-N-(phénylsulfonyl)indoles. Pour la molécule précurseur sélectionnée,  $R^1 = H$ ,  $R^2 = Me$  avec une fixation sur le carbone 4 (d'après Zhou et al., 2005).

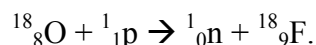
Le premier objectif, en collaboration étroite avec un laboratoire de chimie de l'université Lyon 1 (Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR CNRS 5246), est de réussir le radiomarquage d'une molécule précurseur sélectionnée pour ses caractéristiques *in vitro* envers les 5-HT<sub>6</sub>, avec une excellente affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ( $Ki_{(5-HT_6)} = 1 \pm 0,1$  nM), et une très bonne sélectivité vis-à-vis des récepteurs 5-HT<sub>7</sub> ( $Ki_{(5-HT_7)} = 2200 \pm 154$  nM).

Le second, me concernant plus particulièrement, consiste à mener les expériences de validation biologique préclinique par imagerie isotopique, afin de proposer, à terme, un radiotraceur 5-HT<sub>6</sub> transposable à l'homme.

## C. Matériels et Méthodes

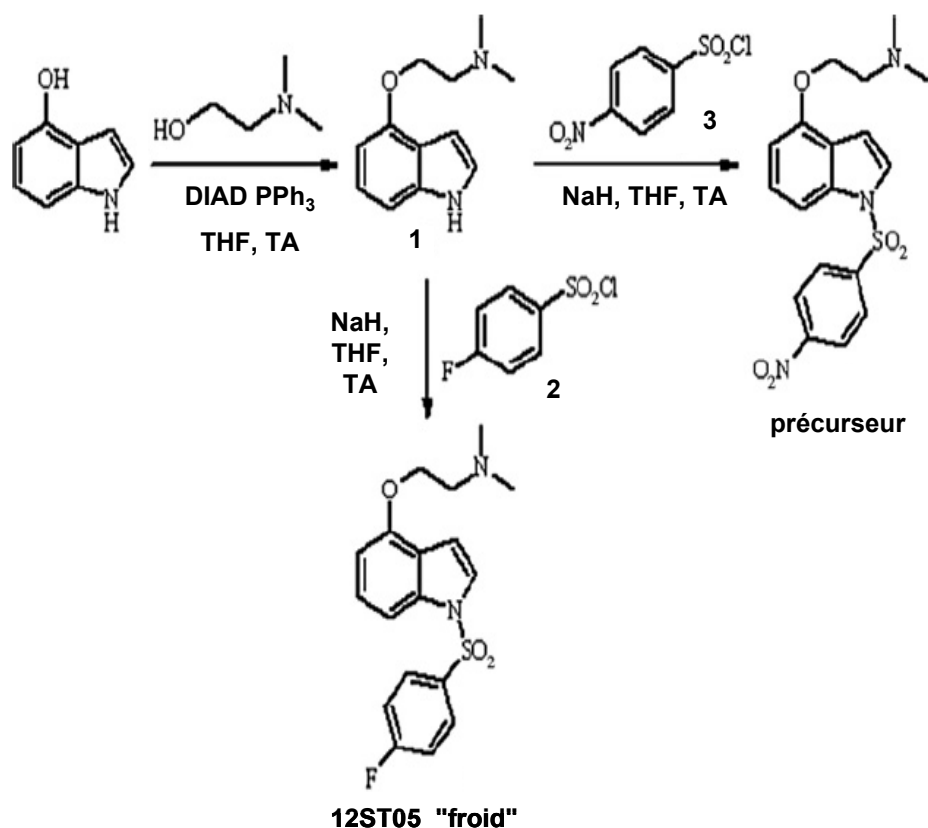
### 1. La radiosynthèse du [ $^{18}\text{F}$ ]12STo5

Le fluor 18 est produit grâce au cyclotron par la réaction (p,n) sur une cible d'eau enrichie en oxygène 18:



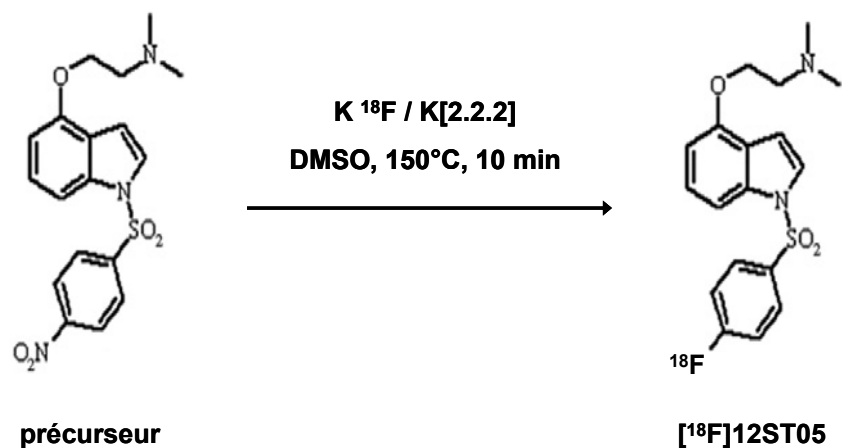
Le fluor 18 est obtenu sous sa forme fluorure ( $^{18}\text{F}^-$ ) puis est concentré sur une cartouche extraction en phase solide type QMA. Les radiosynthèses au fluor 18 sont effectuées à l'aide d'un automate de fluoration type FDG (Coïncidence<sup>TM</sup>, Bioscan®, USA).

La synthèse du précurseur a été effectuée par le Dr Sandrine Tang au laboratoire de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR CNRS 5246 (travaux de thèse). Le *N*-[2-(1H-Indol-4-yloxy)éthyl]-*N,N*-diméthylamine **1** (301 mg, 1,50 mM) dans du THF (5 mL) et le chlorure de 4-nitrophénylsulfonyl **3** (327 mg, 1,50 mM) sont ajoutés dans une solution de NaH (88 mg, 2,25 mM) dans du THF (20 mL). Après 16 h à température ambiante, la solution est refroidie à 0°C, et de l'eau est ajoutée. Le mélange est séparé en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et de l'eau. La phase aqueuse est extraite par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  puis évaporée sous faible pression. Le résidu est purifié par chromatographie "flash" avec  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 95/5 comme éluant, pour donner le *N,N*-Diméthyl-*N*-[2-(1-[(4-nitrophényl)sulfonyl]-1H-indol-4-yloxyéthyl)amine (311 mg, 60%) sous forme solide (**Fig. 33**).



**Figure 33.** Etapes de la synthèse de la molécule précurseur et de la référence "froide" 12ST05. 2, chlorure de 4-fluorophénylsulfonyl (travaux effectués par S.Tang).

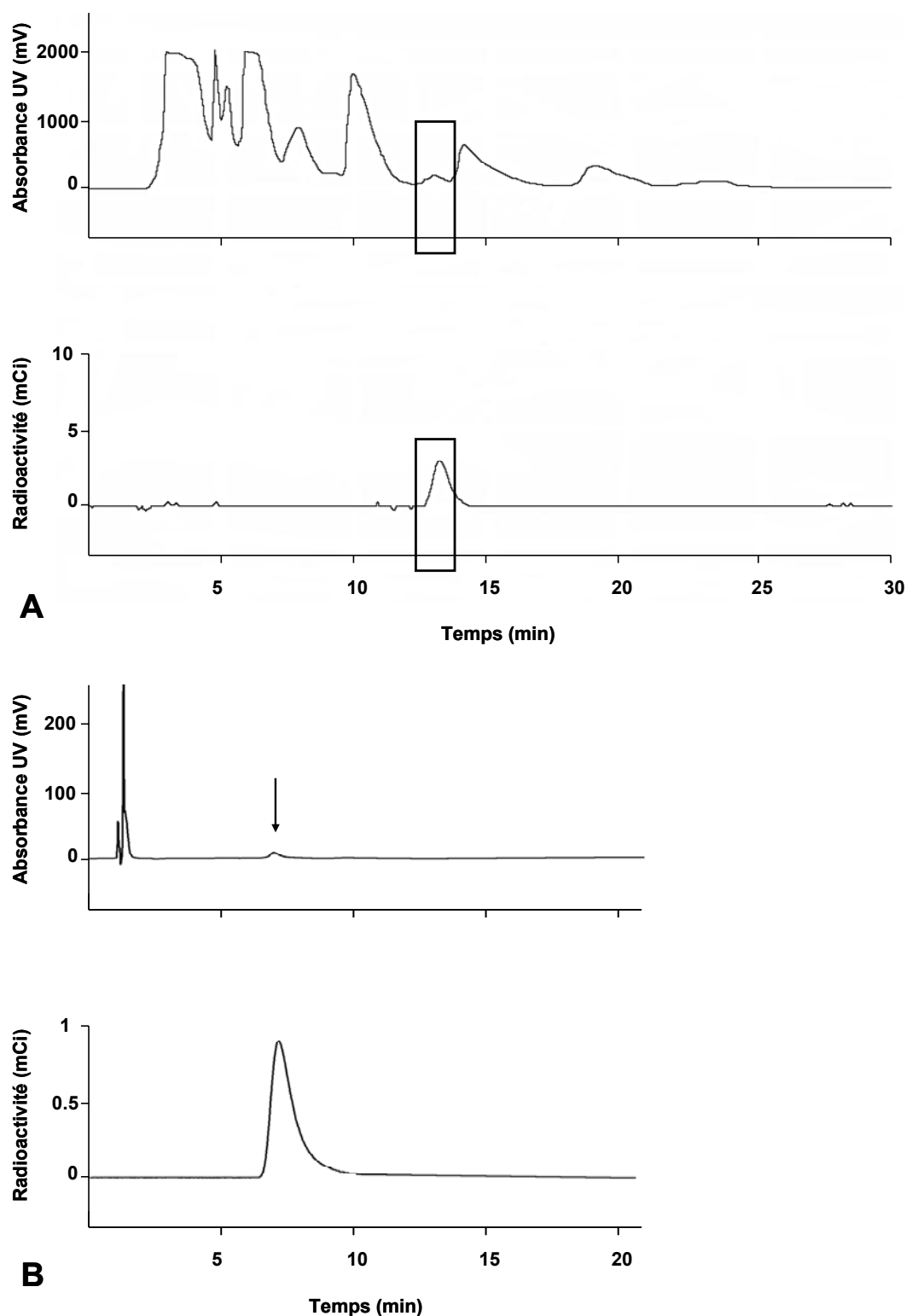
Le fluor produit par le cyclotron réagit dans les réactions de radiosynthèse en présence d'un carbonate alcalin, souvent K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Le K<sup>18</sup>F formé réagit avec 10 mg de précurseur dans le DMSO (3mL) à 150°C pendant 10 minutes et en présence de Kryptofix 2.2.2 (**Fig. 34**).



**Figure 34.** Radiosynthèse du [<sup>18</sup>F]12ST05.

Le mélange est ensuite purifié sur cartouche d'extraction phase solide C18 retenant les composés organiques puis par HPLC semi-préparative avec une colonne (Semiprep Symmetry C18, 7 $\mu$ m, 7,8 x 300 mm). Le mélange réactionnel est ensuite séparé par HPLC préparative (C18 phase inverse) permettant la purification et l'isolement de la molécule radiomarquée. L'élution se fait dans un mélange THF/eau pH 5,0/MeOH : 4/9/1 avec un débit de 2,5 mL.min<sup>-1</sup>. Le temps de rétention du [<sup>18</sup>F]12ST05 est de 13 minutes dans ces conditions. La pureté de la fraction récupérée est ensuite vérifiée par HPLC analytique à détection UV à barrette de diodes, couplé à un détecteur de radioactivité. Dans un mélange de solvants THF/eau pH 5,0/MeOH : 4/15/6 et avec un débit de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, l'analyse HPLC ne met en évidence qu'un seul composé présent dans la fraction, au temps de rétention correspondant au composé fluoré froid. Le rendement radiochimique est de 32% corrigé de la décroissance, la pureté radiochimique > 95% et l'activité spécifique du produit final comprise entre 85 et 120 GBq. $\mu$ mol<sup>-1</sup> (EOS pour end of synthesis) (**Fig. 35**).





**Figure 35.** (A) Chromatogramme (HPLC préparative) après radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]12\text{ST}05$ . Absorbance UV à 254 nm en haut et radioactivité en bas. Les temps de rétention du précurseur et du  $[^{18}\text{F}]12\text{ST}05$  sont respectivement de 13 et 14 min. (B) Chromatogramme du  $[^{18}\text{F}]12\text{ST}05$  avant son utilisation. Absorbance UV à 254 nm en haut et radioactivité en bas. Le temps de rétention du  $[^{18}\text{F}]12\text{ST}05$  est de 7 min (flèche noire). La pureté radiochimique > 98%.

## **2. Les animaux**

### **a. Les rats**

Des rats mâles adultes, de souche Sprague-Dawley (Charles River, France), pesant  $250 \pm 100$  g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C), d'humidité (50%) et de luminosité (lumière artificielle de 7h00 à 19h00), avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Une phase d'acclimatation minimale de 3 jours est observée entre le jour d'arrivée des animaux et le jour de l'expérimentation.

### **b. Les chats**

Les expérimentations en tomographie par émission de positons (TEP) sont réalisées sur des chats ( $4 \pm 0,5$  kg) mâles (Iffa-Credo, Lyon, France) hébergés dans des conditions standards (24°C et 50% d'humidité) avec un cycle jour/nuit de 12/12h. Les expérimentations sont conduites en accord avec le comité français d'éthique animale et avec les directives du conseil de la communauté européenne (86/609/EEC). Par soucis éthiques, nous n'avons utilisés qu'un seul chat pour l'évaluation biologique du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 (traceur des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>).

### **c. L'anesthésie**

Toutes les procédures expérimentales de longue durée (>2 heures) effectuées chez les rats sont réalisées sous anesthésie à l'uréthane (Sigma-Aldrich, France). Cet anesthésique est administré à une dose unique par voie intrapéritonéale et à raison de  $1,7 \text{ g.kg}^{-1}$  de poids corporel. Le choix de l'anesthésique est motivé par sa durée d'action (8-10h) et les dépressions cardiaques et respiratoires minimales qu'il engendre. L'anesthésie provoquant une hypothermie, le rat est placé sur un tapis chauffant thermostaté (CMA/Microdisquettes 150) permettant son maintien à une température de  $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ .

L'anesthésie des chats est induite par insufflation d'un mélange d'air médical ( $1,5 - 2 \text{ L.min}^{-1}$ ) et d'isoflurane (AErane, Baxster, France) à 4% dans une boîte hermétique. Elle est ensuite maintenue par insufflation d'isoflurane (2,5%) sans intubation, et en respiration spontanée pour toute la durée de l'examen TEP. L'animal anesthésié est placé sur un tapis chauffant à circulation d'eau afin d'éviter tout risque d'hypothermie.

#### **d. La cathétérisation**

L'administration des radiotraceurs TEP s'effectue uniquement par voie intraveineuse. Chaque rat anesthésié subit une cathétérisation (cathéter et polyéthylène, diamètre = 0,58 mm, A-M SYSTEMS, Inc<sup>®</sup>, USA) d'une veine caudale afin de permettre l'injection ultérieure du radiotraceur.

Chez les chats, un cathéter stérile et apyrogène (Fresenius Vial, Bressin, France) est inséré au niveau de la veine surale pour l'injection du radiotraceur.

### **3. Lipophilie *in vitro* et pénétration cérébrale *ex vivo***

La lipophilie (log P) est évaluée par le calcul du coefficient de partition dans un mélange *n*-octanol et 50 mmol.L<sup>-1</sup> de tampon Tris-HCl (pH 7,4). Le log P correspond à la concentration du [<sup>18</sup>F]12ST05 dans le *n*-octanol par rapport à sa concentration dans le tampon.

Pour l'évaluation du passage cérébral du [<sup>18</sup>F]12ST05 *ex vivo*, deux séries de 4 rats sont anesthésiés, cathétérisés puis euthanasiés par décapitation 5, 10, 20 et 60 min après l'injection en bolus de 55,5 MBq de [<sup>18</sup>F]12ST05. Les cerveaux sont rapidement prélevés, rincés avec de l'eau distillée puis passés au compteur-gamma (Cobra II; Packard, Meriden, CT, USA) pour évaluation de la radioactivité qui a passé la BHE.

### **4. L'autoradiographie**

#### **a. Principe général**

L'autoradiographie est une technique se basant sur l'utilisation d'une molécule couplée à un isotope radioactif (un radiotraceur), qui de part sa structure tridimensionnelle va se fixer à la structure moléculaire d'intérêt. Dans nos études, nous nous sommes intéressés à la détection qualitative et/ou semi-quantitative de structures protéiques (récepteurs sérotoninergiques) présentes sur des coupes de cerveau de rat.

Nous avons utilisé le phosphor-imageur (BAS 1800 II, Fujifilm). Le film ou écran utilisé avec le phosphor-imageur est composé d'une fine couche de cristaux photostimulables déposée sur un support en polyester. L'ensemble est recouvert d'une fine protection en

plastique. Lorsque l'échantillon à analyser est mis au contact de cet écran, les particules chargées ou les rayonnements électromagnétiques peuvent déplacer les électrons de certains cristaux vers un état transitionnel durable. Ces électrons, piégés de manière prolongée entre les bandes de valence et les bandes de conduction, sont dans une situation de "transition interdite", créant ainsi une image latente d'électrons excités. L'énergie, ainsi stockée, va pouvoir être libérée par stimulation du phosphore avec un faisceau laser hélium-néon qui provoque une émission de lumière bleue. Cette luminescence est captée par un photomultiplicateur et l'image est constituée point par point par balayage de la plaque en quelques minutes. La finesse du faisceau laser et son pas de déplacement par rapport au plan des cristaux conditionnent la résolution finale de l'image (50  $\mu\text{m}$ ). La surface des plaques est de 20 x 25  $\text{cm}^2$  et elles sont réutilisables (régénération par une source secondaire de lumière) (voir [Barthe 2007](#), pour revue).

### ***b. L'autoradiographie in vitro chez le rat***

Les rats sont euthanasiés par décapitation après une induction "flash" à l'isoflurane. Le cerveau est prélevé, rincé dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à  $-30^\circ\text{C}$  par l'ajout de carboglace. Les cerveaux sont, soit conservés à  $-80^\circ\text{C}$ , soit directement utilisés. Des coupes coronales de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm Microtech, France) à  $-20^\circ\text{C}$ , dans les régions d'intérêts (striatum, hippocampe, cervelet), avec l'aide d'un atlas stéréotaxique du rat ([Paxinos et Watson, 1986](#)), puis fixées par adhérence sur des lames de verres sèches (Starfrost®). Les lames sont ensuite conservées quelques jours à  $-80^\circ\text{C}$  avant les expériences d'autoradiographie.

Le jour où la radiosynthèse est programmée, les lames congelées au  $-80^\circ\text{C}$  sont placées à température ambiante durant 30 minutes minimum. Elles sont ensuite incubées durant 20 minutes, à température ambiante, dans 50mM du tampon TBS-HCl pH 7,5 (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, Sigma-Aldrich, France) contenant 1  $\mu\text{Ci.mL}^{-1}$  du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05, [ $^{18}\text{F}$ ]-F15599. La fixation non-spécifique est déterminée par l'ajout de sérotonine en excès (10  $\mu\text{M}$ ) dans le bain d'incubation. Les lames sont lavées 90 secondes dans 50 mM du tampon TBS-HCl pH 7,5 à  $4^\circ\text{C}$  puis 90 secondes dans de l'eau distillée à  $4^\circ\text{C}$  avant d'être séchées par un léger flux d'air ambiant. Les lames sont apposées contre les écrans ou films du phosphor-imageur (BAS 1800 II, Fujifilm) pendant 60 minutes dans une cassette. Puis les images sont

révélées en quelques minutes par le logiciel "Image Reader". Le logiciel d'analyse d'images "Multigauge" permet une analyse semi-quantitative de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans les régions d'intérêts, manuellement tracées à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau du rat (Paxinos et Watson, 1986). Le bruit de fond est soustrait à toutes les valeurs semi-quantitatives obtenues. Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en  $\text{psl.mm}^{-2}$  ("photo-stimulated luminescence" par unité de surface).

### **c. L'autoradiographie *ex vivo* chez le rat**

Les rats sont anesthésiés intrapéritonéalement à l'uréthane ( $1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) puis un cathéter est introduit au niveau d'une veine latérale de la queue. Pour les expériences de compétition, les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (SB-258585 (Tocris Biosciences, Royaume-Uni) ou Ro 04-6790 (Sigma-Aldrich, Allemagne)), ou le 12ST05 "froid", sont injectés par voie intraveineuse à une dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , 30 minutes avant l'injection en bolus de 55,5 MBq du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Les rats sont euthanasiés par décapitation 20 minutes après l'injection du radiotraceur. Le cerveau est prélevé, rincé dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à  $-30^{\circ}\text{C}$  par l'ajout de carboglace. Des coupes coronales de  $30 \mu\text{m}$  sont réalisées au cryostat (Microm Microtech, France) à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans les structures d'intérêts (striatum, hippocampe, cervelet) à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau du rat (Paxinos et Watson, 1986), puis fixées par adhérence sur des lames de verres sèches (Starfrost®). Les lames séchées à température ambiante suivent ensuite la même procédure que pour l'autoradiographie *in vitro* (60 min d'imprégnation d'écran, révélation puis analyse informatique).

## **5. L'imagerie TEP chez le chat**

Nous disposons au CERMEP d'une caméra Ecat Exact HR+ fabriquée par CTI (Knoxville, Tennessee, USA) et commercialisée par Siemens. Cette caméra présente une résolution dans le plan axial de 4,1 mm et une résolution transverse de 4,4 mm, ce qui permet de générer 63 coupes cérébrales conjointes d'une épaisseur de 2,46 mm. L'acquisition est réalisée en mode tridimensionnel.

Le chat anesthésié à l'isoflurane (2,5%) est placé en décubitus ventral sur le lit du tomographe. Il est fixé dans un système de contention en plexiglas (Unimécanique, France) permettant un positionnement stable et reproductible de la tête de l'animal sous la caméra clinique TEP. La tête de l'animal est maintenue au niveau des conduits auditifs, de l'arête orbitale et du maxillaire supérieur par l'intermédiaire de barres d'oreilles, et d'une barre de gueule. La température corporelle de l'animal est maintenue à 37°C par une couverture chauffante à circulation d'eau (Hamilton Industries, Ohio, USA). Les rythmes cardiaques et respiratoires sont contrôlés durant toute la durée de l'examen par un oxymètre, compteur de pouls et détecteur de gaz carbonique (Nonin 9847V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA). Un scanner de transmission est réalisé pendant 10 min avec des sources linéaires de germanium ( $^{68}\text{Ge}$ ) – gallium ( $^{68}\text{Ga}$ ).

Le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 est injecté en bolus de 74 MBq via la veine surale. L'activité spécifique du radiotraceur se situe entre 85 et 120 GBq. $\mu\text{mol}^{-1}$  au moment de l'injection. La quantité de radioactivité est mesurée sur une série de 31 séquences ("frames") de durées croissantes de 30 secondes à 10 minutes pour une durée totale de 90 minutes. Après l'acquisition, les images sont reconstruites selon le plan frontal. Les régions d'intérêts (ROI pour "regions of interest" en anglais) sont tracées manuellement dans le striatum, le thalamus, le cortex cingulaire, l'hippocampe et le cervelet avec l'aide de deux atlas stéréotaxiques du cerveau du chat (Jasper et Ajmone-Marsan, 1954; Snider et Niemer, 1961). Les courbes d'activités régionales sont exprimées en Becquerel par unité volumique (Bq.cm $^{-3}$ ).

## D. Résultats

### 1. Synthèse chimique et radiomarquage

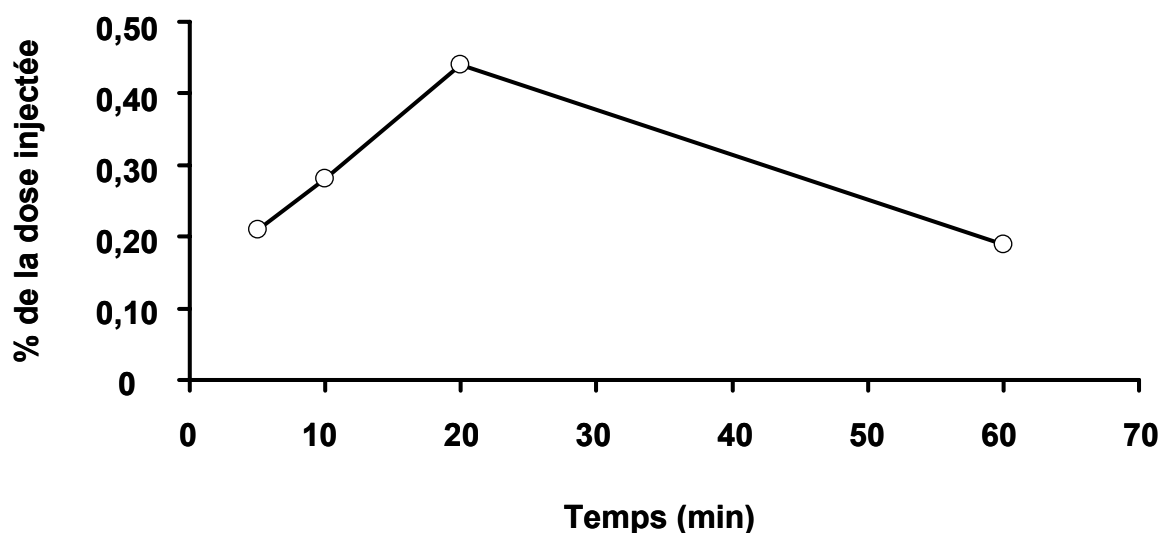
Les expériences de synthèse du précurseur ont été réalisées par le Dr Sandrine Tang de l'ICBMS (UMR CNRS 5246, Université Lyon 1) (cf **Fig. 33**, Matériels et Méthodes).

Le radiomarquage au fluor 18 du 12ST05, à partir de son précurseur nitro, a été réalisé à 150°C par un automate de fluoration reprogrammé (utilisé en routine pour la synthèse de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG), en un temps de 50 min. Une HPLC préparative a permis une bonne séparation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 de son précurseur nitro. Le rendement radiochimique était de 32% corrigé de la

décroissance, la pureté radiochimique > 95% et l'activité spécifique du produit final comprise entre 85 et 120 GBq.μmol<sup>-1</sup> (EOS pour end of synthesis) (cf **Fig. 34**, Matériels et Méthodes).

## 2. Lipophilie *in vitro* et pénétration cérébrale *in vivo*

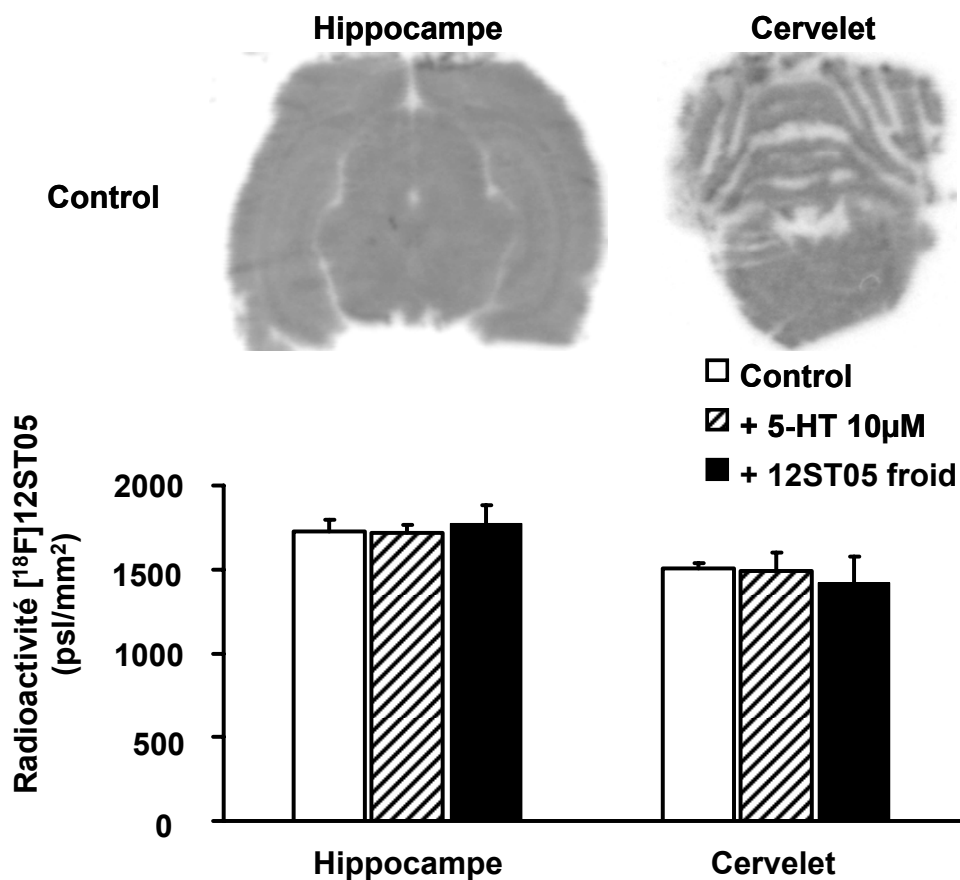
La lipophilie du [<sup>18</sup>F]12ST05 a été déterminée *in vitro* par l'analyse du coefficient de partition (Log P) dans un mélange octanol/eau, log P = 2,03 ± 0,03 (n = 5 expériences). Cette valeur a été confirmée par le Log P calculé par logiciel informatique (Log P = 2,2 à pH 7,0; ACD/Labs software, version 7.0). Les pourcentages de doses injectées au niveau cérébral 5, 10, 20 et 60 min après l'injection du [<sup>18</sup>F]12ST05 ont été calculées à respectivement 0,21%, 0,28%, 0,44% et 0,19%. Ainsi, le pic de fixation cérébral du [<sup>18</sup>F]12ST05 se situe à environ 20 min post-injection (**Fig. 36**).



**Figure 36.** Cinétique radioactive cérébrale du [<sup>18</sup>F]12ST05 étudiée chez le rat *ex vivo* à 4 délais post-injection (5, 10, 20 et 60 min). On peut remarquer un bon passage cérébral avec une cinétique d'entrée lente (pic à 20 min).

### 3. Autoradiographies *in vitro* chez le rat

Les valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 *in vitro* ont été comparables entre les régions riches (hippocampe, striatum) et les régions pauvres en récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (cervelet). D'autre part, ni l'incubation préalable de sérotonine, ni celle de 12ST05 froid en excès, n'a modifié la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 (**Fig. 37**).

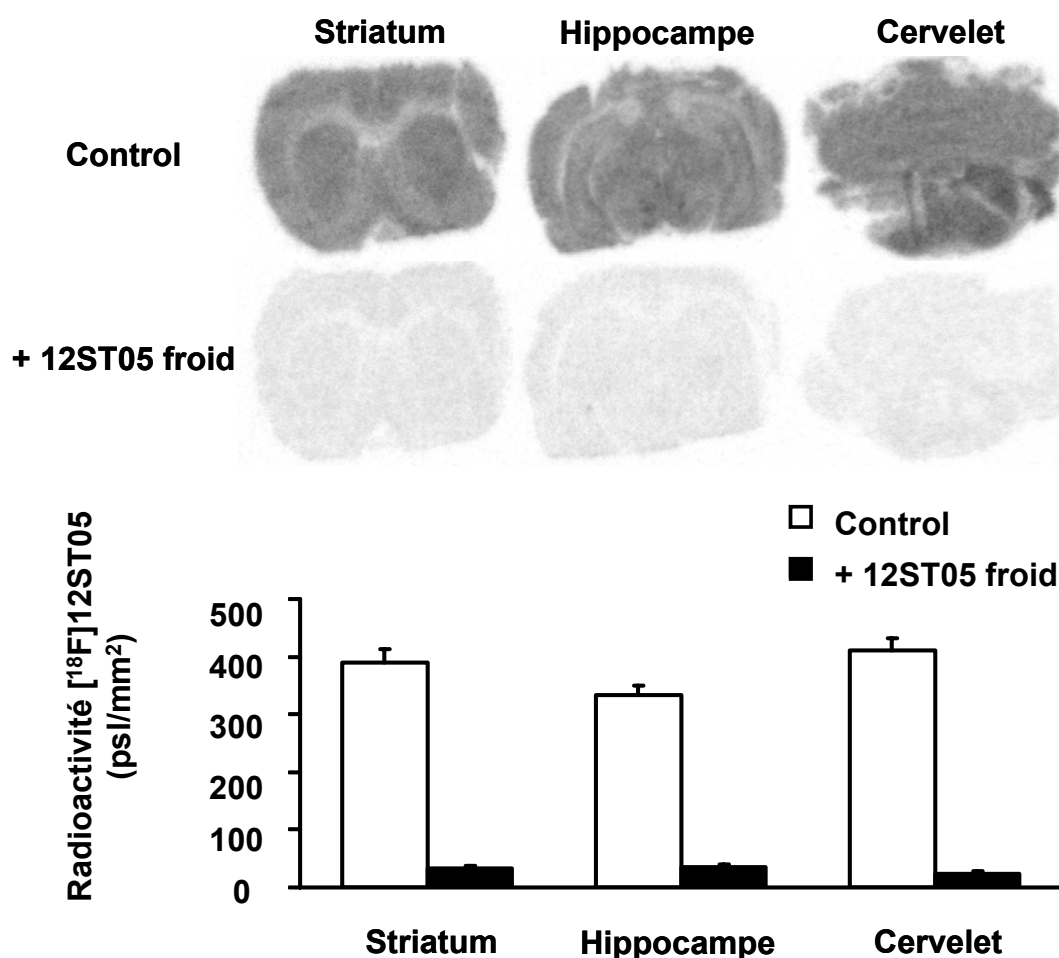


**Figure 37.** Autoradiographies *in vitro* au [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 effectuées sur des coupes d'hippocampe et de cervelet de rat témoins (en haut). Les histogrammes représentent les valeurs semi-quantitatives de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 sur des coupes d'hippocampe et de cervelet de rat témoins, préincubées avec de la sérotonine (10 µM), ou avec du 12ST05 froid en excès (en bas) (valeurs exprimées en psl.mm<sup>-2</sup>).



#### 4. Autoradiographies *ex vivo* chez le rat

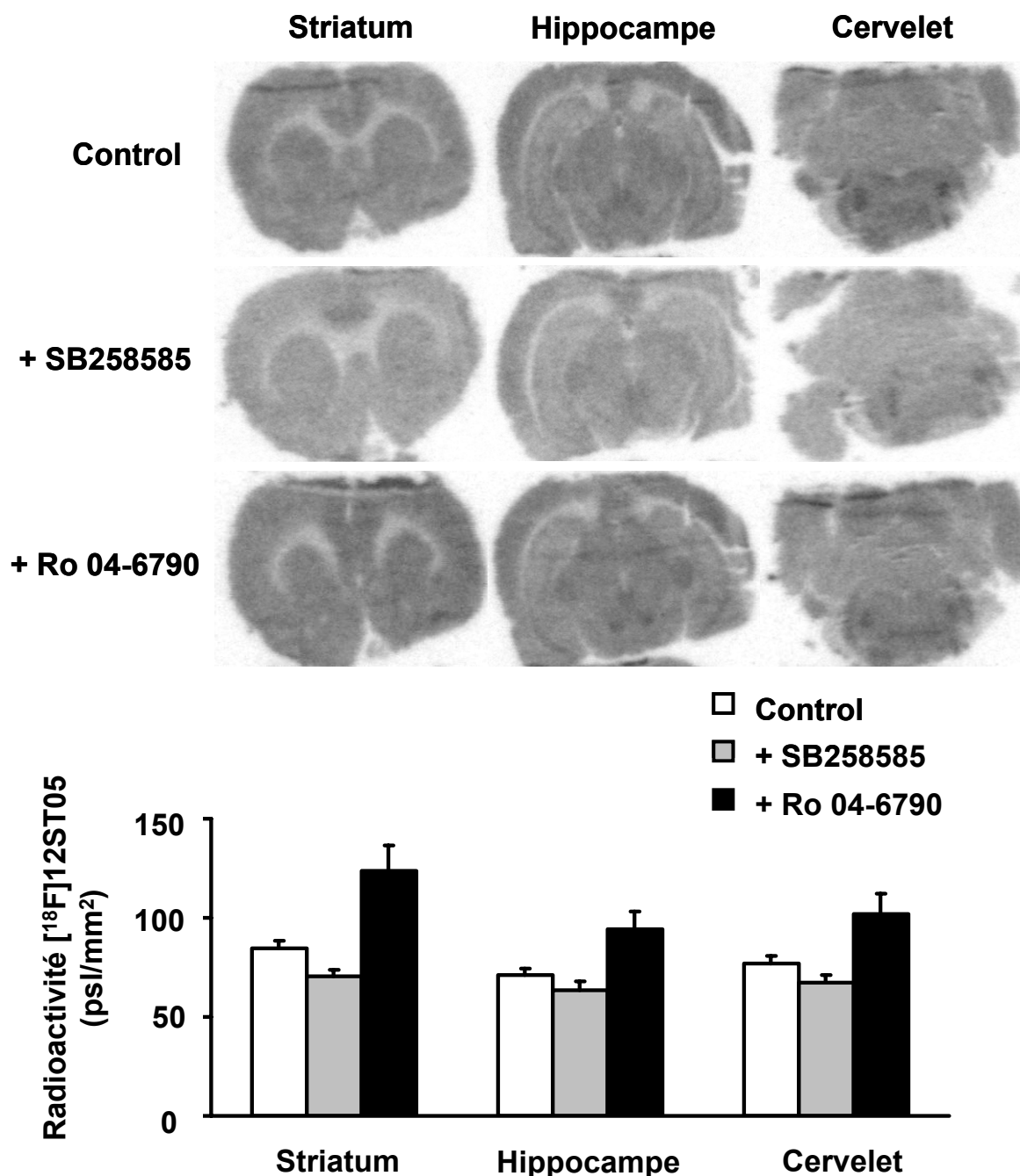
Les autoradiographies *ex vivo* réalisées chez des rats témoins, 20 min après l'injection du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05, ont confirmé le bon passage de la BHE et l'accumulation cérébrale. Les régions riches en récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (hippocampe, striatum) et les régions qui en sont peu pourvues (cervelet), ont montré un marquage comparable au [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. La préinjection de 12ST05 froid, 30 min avant l'injection du traceur radioactif, est parvenue à effacer la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 (-92%;  $p < 0,5$ ) dans toutes les régions analysées (**Fig. 38**).



**Figure 38.** Autoradiographies *ex vivo* au [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 de coupes de striatum, d'hippocampe et de cervelet de rats témoins (control) et de rats préinjectés avec du 12ST05 froid (5 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.), 30 min avant l'injection du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Les histogrammes représentent les valeurs semi-quantitatives correspondantes de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 (psl.mm<sup>-2</sup>).

La préinjection de SB258585, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, a réduit la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 de 17% dans le striatum ( $p < 0,5$ ), 11% dans l'hippocampe ( $p < 0,5$ ) et 8% dans le

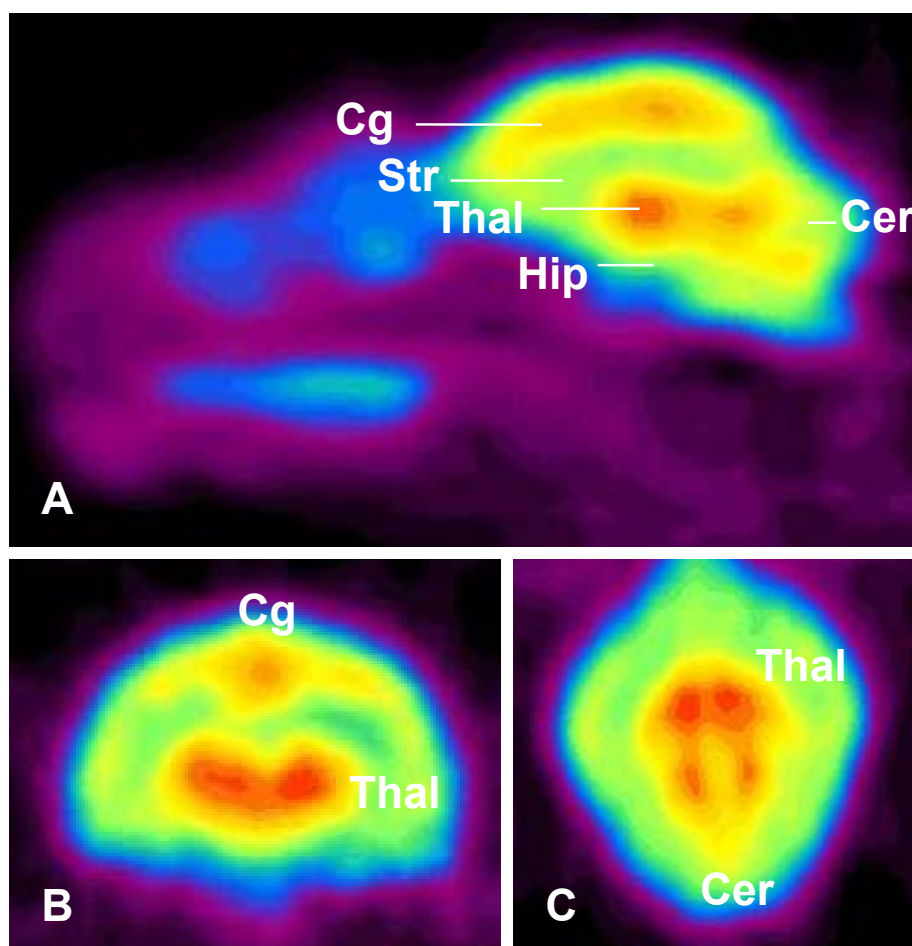
cervelet (**Fig. 39**). Lorsque le Ro 04-6790, un autre antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, a été préinjecté, la fixation du [<sup>18</sup>F]12ST05 a été augmentée de +46% dans le striatum, de +32% dans l'hippocampe et de +33% dans le cervelet ( $p < 0,5$ ;  $n = 2$ ) (**Fig. 39**).



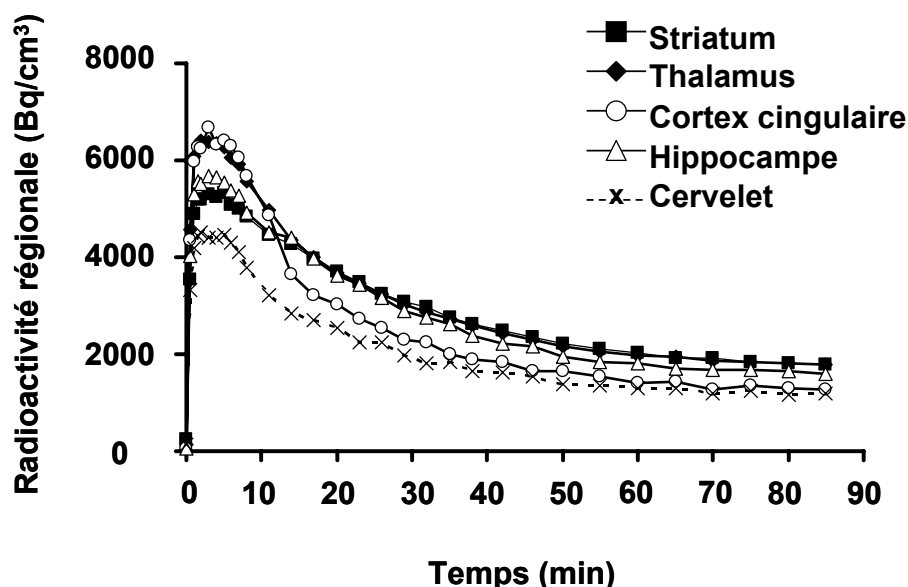
**Figure 39.** Autoradiographies *ex vivo* au [<sup>18</sup>F]12ST05 de coupes de striatum, d'hippocampe et de cervelet de rats témoins ("control"), en comparaison de rats préinjectés avec du SB258585 (5 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.), du Ro 04-6790 (5 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.), 30 min avant l'injection du [<sup>18</sup>F]12ST05 (55,5 MBq i.v.). Les histogrammes représentent les valeurs semi-quantitatives correspondantes de la fixation du [<sup>18</sup>F]12ST05 (psl.mm<sup>-2</sup>).

## 5. Imagerie TEP chez le chat

L'injection intraveineuse de [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 chez le chat conduit à son accumulation intracérébrale dans les premières 5-10 min. Les courbes de cinétiques radioactives régionales ont montré une forte intensité de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans le striatum, l'hippocampe, le thalamus, le cortex cingulaire et le cervelet (**Fig. 40**). Les ratios entre la fixation des régions riches en récepteurs 5-HT<sub>6</sub> comme le striatum, l'hippocampe, et la fixation dans le cervelet (région pauvre en 5-HT<sub>6</sub>), ont été respectivement calculés à 1,39 et 1,40, 10 min après l'injection du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. La région présentant la plus forte intensité de fixation, par rapport au cervelet, a été le thalamus, avec un ratio de 1,55 tout au long de l'acquisition. L'élimination du radiotracer des différentes régions cérébrales est comparable, excepté pour le cortex cingulaire, région la plus rapide à évacuer le radiotracer (**Fig. 41**).



**Figure 40.** Images TEP de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans le cerveau d'un chat, dans le plan sagittal (A), coronal (B) et transversal (C). On peut noter un important marquage thalamique. Str, striatum; Thal, thalamus; Cg, cortex cingulaire; Hip, hippocame; Cer, cervelet.



**Figure 41.** Cinétiques régionales radioactives du  $[^{18}\text{F}]12\text{ST}05$  au niveau du cerveau d'un chat suivant un examen TEP.

## E. Discussion

Les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> sont parmi les récepteurs sérotoninergiques les plus récemment découverts (Monsma et al., 1993; Ruat et al., 1993a). Un certain nombre de caractéristiques ont focalisé notre attention sur ces récepteurs dans la MA.

(i) Leur localisation préférentiellement cérébrale (Ruat et al., 1993a) avec une présence d'ARNm en forte densité dans les couches granulaires et pyramidales de l'hippocampe (Ward et al., 1995) et protéique sur les dendrites des neurones de ces couches hippocampiques (Gérard et al., 1997).

(ii) L'affinité des antipsychotiques atypiques et des antidépresseurs tricycliques pour ces récepteurs 5-HT<sub>6</sub> a renforcé l'intérêt d'étudier les ligands 5-HT<sub>6</sub>.

(iii) Le fait que des antagonistes 5-HT<sub>6</sub> puissent augmenter la concentration extracellulaire en acétylcholine (Reimer et al., 2003) et en glutamate (Dawson et al., 2001) dans l'hippocampe et le cortex frontal de rat, a permis de proposer les propriétés procognitives de ces molécules. En effet, il est reconnu que les systèmes glutamatergiques et cholinergiques participent au processus cognitifs et sont impliqués dans les perturbations mnésiques et la MA (Bartus et al., 1982; Collindridge et al., 1983; Coyle et al., 1983; Greenamyre et Young, 1989). Plusieurs études ont démontré que les antagonistes 5-HT<sub>6</sub> sont procognitifs chez le rat (Meneses, 2001; Rogers et al., 1999, 2000; Woolley et al., 2001, 2003), posant les bases

précliniques d'une recherche tournée vers la MA. Ainsi, l'activité de recherche autour des ligands des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> a renforcé l'intérêt de disposer de traceurs sélectifs utilisables en imagerie TEP *in vivo* chez l'homme.

L'objectif de mes travaux s'inscrivait dans le cadre de l'évaluation biologique chez le rat de nouvelles molécules potentiellement traceuses des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Récemment, une équipe a rapporté le radiomarquage au carbone 11 d'un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> mais son évaluation en imagerie TEP clinique chez l'homme a révélé un marquage non-spécifique des récepteurs 5-HT<sub>2</sub> (Martarello et al., 2008). C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à une étude de Zhou et al. (2005), qui avait caractérisé *in vitro* une nouvelle série de molécules sélectives pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, les 4-(2-aminoéthoxy)-N-(phénylsulfonyl)indoles. Nous avons sélectionné une des structures proposées qui présentait une forte affinité envers les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ( $K_i = 1$  nM) et une excellente sélectivité par rapport aux récepteurs 5-HT<sub>7</sub> (>2000 fois). L'équipe de chimie avec laquelle nous avons collaboré (Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, UMR CNRS 5246) a réussi la synthèse du précurseur, avec quelques modifications chimiques en comparaison de la structure initiale proposée par l'équipe de Zhou. En effet, un groupement NO<sub>2</sub> devait être ajouté pour permettre le radiomarquage au fluor 18. La fluoration a été réalisée par la substitution nucléophile du groupement nitro par le fluor 18 avec l'aide d'un automate Coincidence (GE Mx) reprogrammé, et a permis d'obtenir le [<sup>18</sup>F]12ST05 dans des quantités suffisantes pour les évaluations biologiques.

Bien que le calcul empirique de la lipophilie d'une molécule candidate ne soit pas toujours prédictif de son passage de la BHE (Wilson et al., 2001), le calcul du log P du [<sup>18</sup>F]12ST05 était encourageant (log P = 2,03 ± 0,03; n = 5 expériences). Ce résultat *in vitro* s'est révélé être confirmé par la très bonne pénétration cérébrale du [<sup>18</sup>F]12ST05 constatée *in vivo*, en comparaison de radiotraceurs bien validés (Waterhouse, 2003).

Par contre, les résultats obtenus par autoradiographie *in vitro* se sont révélés décevants, démontrant que le [<sup>18</sup>F]12ST05 ne présentait ni l'affinité, ni la sélectivité suffisante pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>.

Cependant, il est à noter que les expériences réalisées *in vitro* ne sont pas toujours prédictives du comportement d'un radiotraceur *in vivo*. Ainsi, nous avons évalué les capacités

du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 à imager les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> *in vivo*. Les autoradiographies *ex vivo* réalisées chez le rat témoin, ont caractérisé la distribution cérébrale du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Les structures riches en 5-HT<sub>6</sub>, comme le striatum et l'hippocampe, ont bien fixé le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Cependant, le cervelet, structure dénuée de récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, a montré une fixation semi-quantitative du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 comparable. Ce résultat, obtenu *in vivo*, a confirmé la non-spécificité du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. La préinjection de 12ST05 "froid" chez le rat a supprimé la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05, attestant d'une saturabilité de sa fixation. Nous avons alors mené des expériences de compétition avec préinjection de différents antagonistes. La préinjection du SB-258585 (Hirst et al., 2000; Roberts et al., 2002) a réduit légèrement le niveau de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans le striatum et l'hippocampe, laissant supposer une fixation partielle aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Cependant, la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans le cervelet a été réduite comparablement, démontrant que le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 fixe une structure tridimensionnelle inconnue mais différente de celle des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. La préinjection du Ro 04-6790, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> connu pour sa bonne pénétration cérébrale (Bös et al., 2001), a provoquée une augmentation de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 dans le striatum, l'hippocampe et le cervelet. L'explication la plus probable est un effet positif du Ro 04-6790 sur le flux sanguin cérébral et sur la pénétration du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 *in vivo*.

Afin de déterminer si les médiocres caractéristiques de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 chez le rat pouvaient être similaires chez le chat, nous avons effectué un examen TEP chez un chat anesthésié. Le cerveau du chat est d'une taille suffisante pour son analyse sous caméra TEP clinique (Aznavor et al., 2006a). La pénétration cérébrale importante observée chez le chat a confirmé les résultats obtenus en autoradiographies *ex vivo* chez le rat. D'autre part, le thalamus, région peu pourvue en récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, a montré une fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 plus importante que dans le striatum et l'hippocampe, durant les premières 10 min d'acquisition. L'examen PET du chat au [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 a globalement montré une fixation homogène élevée du traceur dans le cerveau, confirmant son absence de spécificité pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>.

Selon nous, deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 aux récepteurs 5-HT<sub>6</sub>.

(1) Il est probable que l'ajout du fluor 18 durant l'étape de radiomarquage ait diminué significativement l'affinité du 12ST05 pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> par modification de son pharmacophore. Nous avons pu confirmer, *a posteriori*, cette hypothèse en faisant évaluer, par un organisme extérieur (Cerep France), l'affinité de la molécule fluorée (non-radioactive)

de 12ST05 par des expériences de compétition avec le [ $^3\text{H}$ ]LSD (sur des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> exprimés sur des cellules ovariennes de hamster Chinois). Ces expériences ont révélé que l'ajout d'un atome de fluor avait diminué l'affinité de notre molécule de 5 fois, passant de 4 nM à 20 nM. De la même manière, une étude a rapporté une diminution de l'affinité d'un dérivé phénylsulfonylé pour les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> après fluoration de la molécule (Cole et al., 2005c). Ces résultats mettent en évidence le fait qu'ajouter un atome de fluor durant le radiomarquage peut avoir des conséquences sur la configuration électronique et donc l'affinité d'un pharmacophore pour un type de récepteurs.

(2) La deuxième hypothèse est venue de l'observation d'une saturabilité de la liaison du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 lors de l'injection préalable du produit froid, témoignant d'une affinité pour un site de liaison inconnu. Cette cible ne peut être, ni les récepteurs 5-HT<sub>6</sub> (des antagonistes n'ayant pas d'effet inhibiteur sur la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05), ni tout autre récepteur sérotoninergique (l'ajout préalable de sérotonine ne modifie pas la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05). De plus, l'examen TEP réalisé chez le chat anesthésié a montré que ce site de liaison inconnu était fortement présent dans le thalamus. Des expériences de calcul de la droite de Scatchard pourraient nous donner des informations sur la nature (site unique ou non) et la densité de ce site de liaison.

## F. Conclusion

Nous avons pu réaliser le radiomarquage d'une molécule antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Cependant, les expériences de validation biologique réalisées chez différentes espèces, en *in vitro* et en *in vivo*, ont démontré l'incapacité du [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 à se fixer spécifiquement sur les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Le développement de radiotaceurs des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> reste un objectif majeur, qui apporterait un outil supplémentaire pour l'exploration des fonctions sérotoninergiques cérébrales *in vivo*, et trouverait de multiples applications thérapeutiques potentielles, notamment dans l'amélioration des troubles cognitifs et la MA.

*Ce travail a fait l'objet d'une publication: "Tang S\*, Verdurand M\*, Joseph B, Lemoine L, Daoust A, Billard T, Fournet G, Le Bars D, Zimmer L (2007). Synthesis and biological evaluation in rat and cat of [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand. Nucl Med Biol 34:995-1002". \*contribution équivalente à cet article.*

### III. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et la MA

#### A. Contexte

##### 1. La distribution des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>

L'analyse précise de la distribution régionale et cellulaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a été dépendante des méthodes neuroanatomiques disponibles durant ces dernières décennies. La mise en évidence en 1982 du 8-OH-DPAT (8-hydroxyl-2-(di-N-propylamino)tétralin), un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Hjorth et al., 1982), consécutivement radiomarké au tritium (<sup>3</sup>H), a permis l'apport du premier outil permettant l'identification du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> (Arvidsson et al., 1981; Gozlan et al., 1983). L'autoradiographie sur des coupes de tissus utilisant une série de radioligands ayant la capacité de lier plus ou moins spécifiquement les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> s'est développée par la suite. On peut citer le [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (Hoyer et al., 1986; Vergé et al., 1986), la [<sup>3</sup>H]5-HT (Pazos and Palacios, 1985), l'[\*<sup>3</sup>H]ipsapirone (Dompert et al., 1985), le [<sup>125</sup>I]p-MPPI (Kung et al., 1995) et le [<sup>3</sup>H]WAY100635 (Khawaja, 1995). Ces études ont toutes été effectuées chez le rat. Elles ont montré que les sites de fixation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont particulièrement abondants dans le gyrus denté (DG pour dentate gyrus) et la couche CA1 de la corne d'Ammon de l'hippocampe, le septum latéral, le cortex entorhinal et le cortex frontal. Une expression significative, mais de moindre importance, a également été rapportée dans certains noyaux thalamiques et hypothalamiques. Par contre, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ont rarement été détectés dans le striatum, la substance noire, et le cervelet (voir Lanfumey et Hamon, 2000 pour revue).

L'immunohistochimie utilisant l'anticorps spécifique anti-5-HT<sub>1A</sub> (anti-rat), obtenu chez le lapin, a été utilisée pour détecter les sites de fixation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> chez le rat (El Mestikawi et al., 1990). Une forte densité de marquage a été retrouvée dans les aires limbiques (le septum latéral, les aires CA1, le DG, le cortex frontal et entorhinal), le noyau du raphé antérieur, et le noyau interpedonculaire, en accord avec les résultats obtenus au préalable par autoradiographie (voir Lanfumey et Hamon, 2000, 2004 pour revue). Par contre,



les aires extrapyramidales incluant le putamen, le globus pallidus, et la substance noire, ainsi que le cervelet, ont montré une très faible densité de marquage.

L'étude de la distribution des ARNm des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> par hybridation *in situ* (HIS) a permis de montrer une distribution proche de celle mise en évidence par l'autoradiographie (Miquel et al., 1991), suggérant que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ne sont pas transportés loin de leurs sites de production et qu'ils sont destinés au compartiment somato-dendritique du neurone (voir Lanfumey et Hamon, 2000 pour revue). Ainsi, globalement, la distribution de la densité en protéines 5-HT<sub>1A</sub> (immunohistochimie, autoradiographie) et en ARNm 5-HT<sub>1A</sub> (HIS) est comparable (Kia et al., 1996a, b; Miquel et al., 1991).

Le double marquage immunohistochimique avec un anticorps anti-5-HT et l'anti-5-HT<sub>1A</sub> au niveau des corps cellulaires et dendrites sérotoninergiques (NRD) a montré que toutes les cellules marquées avec l'anti-5-HT<sub>1A</sub>, le sont aussi avec l'anti-5-HT (Sotelo et al., 1990). Ce résultat a démontré qu'au niveau du NRD, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont localisés sur des neurones sérotoninergiques (autorécepteurs). D'autre part, une étude a montré que l'injection d'une neurotoxine sérotoninergique (la 5,7 DHT ou 5,7 dihydroxytryptamine) induit une disparition du marquage autoradiographique au [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT au niveau du NRD (corps cellulaires et dendrites) mais aucune variation au niveau des aires de projection (Vergé et al., 1986). Ce résultat a permis de conclure que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> localisés dans les aires de projections sérotoninergiques, sont situés sur des neurones non-sérotoninergiques (hétérorécepteurs). Plus récemment, la distribution cellulaire et subcellulaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans le noyau du raphé dorsal et la formation hippocampique a été étudiée par immunohistochimie combinée à la microscopie électronique (Riad et al., 2000, 2001). Dans le noyau du raphé dorsal, l'immunoréactivité des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> est observée uniquement sur les corps cellulaires et les dendrites, en particulier le long des portions extra-synaptiques de la membrane plasmique. Dans la formation hippocampique, les somas et les dendrites des cellules pyramidales et des cellules granulaires montrent une immunoréactivité aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

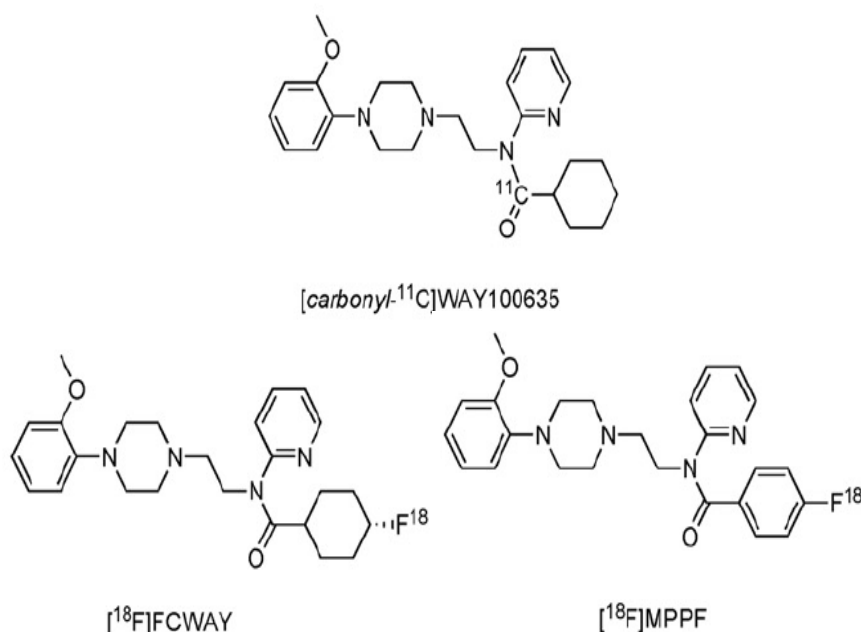
## 2. Les outils pharmacologiques pour étudier les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>

Comme nous l'avons vu, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> font partie du groupe des récepteurs sérotoninergiques couplés à la protéine G<sub>i/o</sub>. Leur stimulation conduit à l'hyperpolarisation de la membrane du neurone qui les porte, contribuant ainsi à réduire les chances de déclenchement d'un potentiel d'action. Autrement dit, les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub> participent principalement à l'inactivation du neurone qui les exprime. Ils possèdent une forte affinité pour la sérotonine ( $K_i = 4,17 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) (Van Wijngaarden et al., 1990). Cependant, une particularité de ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> doit être relevée: les autorécepteurs et les hétérorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub> présentent des différences d'action pharmacologique suite à la fixation d'une même molécule (voir Lanfumey et Hamon, 2000 pour revue). Cette propriété a été initialement expliquée par une plus grande réserve de récepteurs dans les aires somato-dendritiques par rapport aux régions post-synaptiques (Yocca et al., 1990). Ainsi, une même molécule ne produirait pas les mêmes conséquences pharmacologiques au niveau des hétérorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, en faible nombre par rapport aux autorécepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Une autre hypothèse, plus probable, impliquerait des différences dans les propriétés intrinsèques des récepteurs pré et post-synaptiques (de Montigny et Blier, 1992). Une différence de protéine G ( $\alpha_i, \alpha_o, \alpha_z$ ) couplée au récepteur 5-HT<sub>1A</sub> pourrait sous-tendre les différences de fonctionnalités observées (Mannoury la Cour et al., 2006). Cette particularité fait que des molécules ont été décrites comme des agonistes partiels, montrant une activité d'agoniste au niveau des autorécepteurs et d'antagoniste au niveau post-synaptique, comme le pindolol par exemple (Sprouse et al., 2000). Le 8-OH-DPAT est lui considéré comme un agoniste total (Pineyro et Blier, 1999). Le WAY-100635 a été le premier antagoniste pré et post-synaptique découvert (Cliffe et al., 1993).

## 3. L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>

Le développement de molécules synthétiques agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a alimenté le développement de l'imagerie TEP ayant pour objectif la visualisation et l'étude de ces récepteurs *in vivo* (Cliffe, 2000; Passchier et Waarde, 2001; Pike et al., 2000, 2001). La plupart des traceurs 5-HT<sub>1A</sub> appartiennent aux familles structurales développées à partir du WAY100635 ou du 8-OH-DPAT (Kumar et al., 2007).

A l'heure actuelle, on ne dispose d'aucun radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> utilisable chez l'humain *in vivo*. Plusieurs essais ont été réalisés mais sans résultats *in vivo* (voir [Kumar et Mann, 2007](#) pour revue). Assez récemment, le S14506, un agoniste hautement sélectif des 5-HT<sub>1A</sub>, a été marqué au carbone 11 et au fluor 18 mais les évaluations *in vivo* n'ont pas encore été rapportées ([Lu et al., 2006](#)). Une série de molécules avec une structure proche de celle du S14506 a été évaluée. Le [*O*-méthyl-<sup>11</sup>C]2-{4-[4-7-méthoxynaphthalén-1-yl]-pipérazin-1-yl]-butyl}-4-méthyl-2*H*-[1,2,4]triazine-3,5-dione ([<sup>11</sup>C]MPT) a montré des capacités prometteuses comme traceur agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ([Kumar et al., 2006](#)). Bien qu'il ait montré une liaison spécifique aux régions connues pour être riches en 5-HT<sub>1A</sub>, une évacuation lente de ce traceur chez le babouin a rendu difficile sa quantification et la caractérisation de ses propriétés de liaison (notamment la fraction libre dans le sang). Son analogue 2-méthoxyphényl ([<sup>11</sup>C]MMP ou [<sup>11</sup>C]CUMI-101) a révélé de meilleures caractéristiques de liaison que le [<sup>11</sup>C]MPT chez le babouin ([Kumar et al., 2007](#); [Milak et al., 2008](#)). En effet, son pourcentage de fraction libre dans le sang (babouin) a été mesuré à 59 ± 6% et ses métabolites radioactifs sont polaires (incapables de traverser la BHE). Des études chez l'humain sont attendues. Plus récemment, notre équipe au CERMEP, en collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre, a réussi le radiomarquage au fluor 18 d'un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ayant démontré une très bonne sélectivité *in vitro* ([Maurel et al., 2007](#)). Nous avons entrepris la caractérisation biologique de ce radiotracer, le [<sup>18</sup>F]F15599. La distribution *in vitro* chez le rat et le chat a montré qu'il se fixait spécifiquement aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. La proportion de sa fixation représentait 10 - 40% du niveau de fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF dans les mêmes conditions, laissant supposer qu'il marque spécifiquement la population couplée aux protéines G ([Lemoine et al., 2008](#)). Cependant, les expériences *ex vivo* menées chez le rat (autoradiographie) et *in vivo* chez le chat (microPET), ont révélé l'incapacité du [<sup>18</sup>F]F15599 à marquer les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Nous avons vérifié l'absence de métabolites radioactifs cérébraux et proposé qu'il existe des limites au suivi *in vivo* de récepteurs par des traceurs agonistes ([Lemoine et al., 2008](#); [Lima et al., 1997](#)).



**Figure 42.** Structures chimiques des radioligands antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> les plus utilisés en imagerie TEP clinique.

Actuellement, les traceurs 5-HT<sub>1A</sub> utilisés avec succès en imagerie TEP sont tous des antagonistes (**Fig. 42**). Le [*O*-méthyl-<sup>11</sup>C]WAY100635 a initialement été identifié comme traceur *in vivo* des 5-HT<sub>1A</sub> chez le rongeur et le singe (Mathis et al., 1994), puis chez l'humain (Pike et al., 1996). Cependant, la présence de métabolites du [*O*-méthyl-<sup>11</sup>C]WAY100635 traversant la BHE a été révélée, perturbant l'interprétation du signal TEP (fixation spécifique + fixation non-spécifique). Le site du radiomarquage a été modifié en [carbonyl-<sup>11</sup>C]WAY100635, pour générer un traceur se dégradant en métabolites radioactifs polaires ne traversant pas la BHE (Pike et al., 1996). Ce traceur a largement été utilisé dans des études physiopathologiques humaines (Cliffe et al., 1993), pour caractériser les modifications de densité de récepteurs dans différentes pathologies et conditions pharmacologiques. Il a confirmé la localisation des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> principalement dans le système limbique (Pike et al., 1996). Néanmoins, la haute affinité du [carbonyl-<sup>11</sup>C]WAY-100635 pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, a empêché les études compétitives entre traceur et ligand endogène (Hume et al., 2001). C'est pourquoi l'intérêt des radiochimistes s'est porté sur de nouveaux dérivés présentant une bonne sélectivité, mais une affinité moyenne pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. La phényl-pipérazine iodée p-MPPI par exemple, a montré une affinité *in vitro* évaluée à  $3,3 \pm 0,8$  nM (K<sub>i</sub>) chez le rat (Zhuang et al., 1994). Puis le p-MPPF qui s'est avéré être un ligand

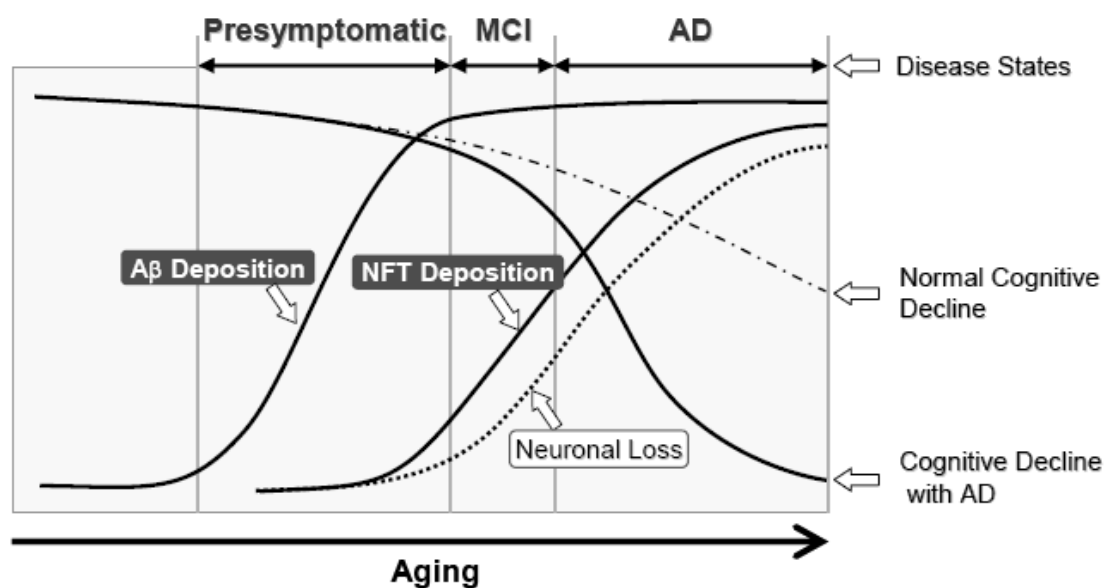
très sélectif des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pré et post-synaptiques (Thielen et Frazer, 1995). Son traceur, marqué au tritium (<sup>3</sup>H]) a été évalué *in vivo*, révélant une affinité importante et sélective envers les 5-HT<sub>1A</sub> (constante de dissociation  $K_d = 3,4 \pm 0,12$  nM et  $B_{max} = 145$  fmol.mg<sup>-1</sup> protéine sur homogénats membranaires d'hippocampe de rat) (Kung et al., 1996). Ces résultats ont encouragé le marquage du MPPF par un isotope émetteur de positons, le fluor 18 (Shiue et al., 1997). La procédure de radiomarquage, basée sur une substitution aromatique nucléophile du précurseur nitro, a été optimisée par Le Bars et al. (1998).

Une première caractérisation par autoradiographie *ex vivo* sur cerveau de rat a montré une entrée rapide du [<sup>18</sup>F]MPPF dans toutes les structures cérébrales, suivie d'une décroissance rapide de la radioactivité. Les cinétiques de décroissance ont été variables selon les structures, avec des vitesses plus élevées au niveau du striatum, du cervelet et dans les régions corticales et plus lentes dans les régions reconnues riches en récepteur 5-HT<sub>1A</sub>, telles que l'hippocampe (Plénevaux et al., 2000). Trente minutes après l'injection du traceur, le rapport d'activité entre hippocampe et cervelet a été calculé à cinq. La liaison carbone-fluor s'est avérée être stable et la métabolisation par défluoruration n'était pas la voie prioritaire. La portion de [<sup>18</sup>F]MPPF distribuée dans le cerveau représentait environ 0,05% de la dose injectée. Les premières études autoradiographiques au [<sup>3</sup>H]MPPF ont montré un marquage du cortex entorhinal, du septum latéral et du noyau du raphé dorsal (NRD). Cette distribution a été confirmée par l'étude Plénevaux et al. (2000) et coïncidait avec les études immunocytochimiques de Kia et al. (1996b). Ces premières études ont donc confirmé la sélectivité du [<sup>18</sup>F]MPPF pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Chez l'animal anesthésié (rat, singe), les études microTEP au [<sup>18</sup>F]MPPF ont confirmé le marquage sélectif de l'hippocampe et du raphé dorsal (Plénevaux et al., 2000). Par la suite, les études précliniques de validation ont été menées chez le chat et comparées avec les données d'autoradiographie *in vitro* au [<sup>3</sup>H]MPPF, [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT et [<sup>3</sup>H]paroxétine (Aznavour et al., 2006a; Ginovart et al., 2000; Le Bars et al., 1998). Elles ont confirmé la distribution spécifique du [<sup>18</sup>F]MPPF dans les structures riches en 5-HT<sub>1A</sub> (hippocampe, gyrus parahippocampique, septum latéral, cortex cingulaire et noyau du raphé). Parallèlement, elles se sont poursuivies afin d'évaluer en phase préclinique la réversibilité de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF, et de quantifier les fixations non-spécifiques (Aznavour et al., 2006a). L'affinité du [<sup>18</sup>F]MPPF pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ( $K_d = 3,4 \pm 0,12$  nM) proche de celle de la sérotonine ( $K_i = 4,17$  nM), a permis d'effectuer une série d'études démontrant que la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF est sensible aux variations de la sérotonine endogène (Rbah, Thèse n°25-2006). Notre équipe a également testé les effets

pharmacologiques d'antidépresseurs (Aznavour et al., 2006b). Une étude récente, visant à évaluer le potentiel de liaison du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF dans un modèle de dépression chez le primate (Shively et al., 2006) a montré une réduction du BP dans l'amygdale, l'hippocampe, le cortex cingulaire et le noyau du raphé. Aux doses d'injection pratiquées en TEP, les études de toxicologie chez le rat ont permis d'éliminer le risque d'effets néfastes chez l'homme. Les premières études de biodistribution et de délimitation cérébrale du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF ont donc pu être menées (Passchier et al., 2000; Passchier et van Waarde, 2001). Ces études ont montré une distribution du traceur conforme à la distribution connue des 5-HT<sub>1A</sub> cérébraux chez l'homme mesurée par autoradiographie (Hoyer et al., 1986). De plus, les cinétiques régionales ont démontré une entrée et une sortie rapide du traceur dans le cervelet et le pons. En revanche, dans les régions limbiques cibles (hippocampes, cortex cingulaire et entorhinal), la sortie du traceur s'est révélée être retardée, atteignant un pseudo-équilibre une vingtaine de minutes après l'injection du traceur (voir Aznavour et Zimmer, 2007, pour revue).

#### 4. L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et de la MA

Nous avons vu dans la première partie, que la MA est déjà bien évoluée avant qu'elle ne devienne symptomatique, qu'elle n'atteigne le stade de démence ou qu'elle ne soit diagnostiquée. D'autre part, il existerait un continuum de régression cognitive allant du sujet sain, en passant par le MCI (Petersen et al., 1999) puis vers la MA (Fig. 43).

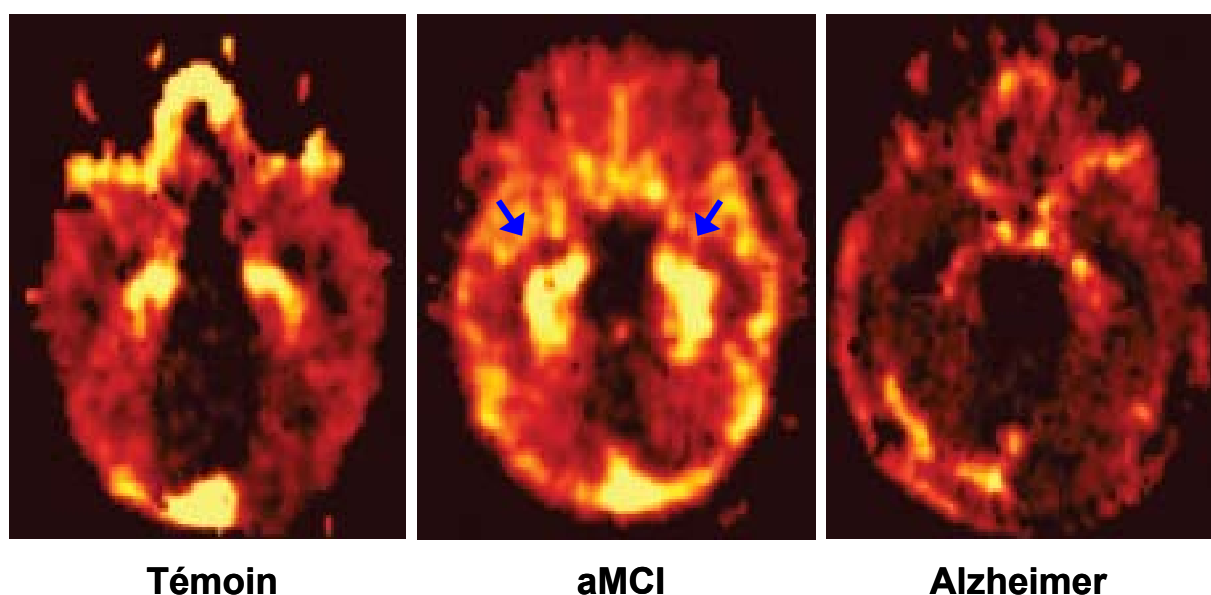


**Figure 43.** Modélisation de la progression neuropathologique de la MA, en parallèle avec son évolution clinique (d'après Furumoto et al., 2007).

Le stade de trouble cognitif léger "mnésique" (aMCI), qui évolue préférentiellement vers la MA, se caractérise par une perturbation des réseaux hippocampiques. D'autre part, l'évolution précoce de la MA voit l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires, accompagnées d'une perte neuronale touchant le cortex entorhinal et l'hippocampe (Braak et Braak, 1991; Delacourte et al., 1999), et corrélés avec les symptômes cognitifs de la démence (Gomez-Isla et al., 1997). Récemment, deux études en imagerie TEP clinique au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF (Kepe et al., 2006; Truchot et al., 2007, 2008) ont montré une atteinte du système sérotoninergique chez des patients neuro-psychologiquement diagnostiqués comme atteints de la MA, comparativement à un groupe de témoins apparié en âge. Plus précisément, l'étude de Kepe et al. (2006) s'est intéressée à trois groupes représentant une évolution vers la MA. Un groupe de patients Alzheimer avérés (cliniquement, score MMSE =  $18 \pm 6$ , radiologiquement et biologiquement;  $n = 8$ ), un groupe de patients MCI (score MMSE =  $27,2 \pm 1,5$ ;  $n = 6$ ) (Flicker et al., 1991; Petersen et al., 1999, 2001; Smith et al., 1996), et un groupe de témoins (score MMSE =  $29,6 \pm 0,5$ ;  $n = 5$ ) appariés en âge aux deux précédents. L'équipe de UCLA a observé, sans surprise, une diminution progressive de la fixation hippocampique du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF à mesure que l'on étudie le cerveau des témoins vers celui des patients MCI puis celui des patients Alzheimer avérés. L'interprétation proposée est la perte de neurones pyramidaux hippocampiques portant ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. La fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF serait donc le reflet de la perte neuronale corrélée à l'atrophie hippocampique observée, phénomène bien décrit dans la maladie d'Alzheimer (Baron et al., 2001).

L'équipe du CERMEP et des Drs Vighetto et Krolak-Salmon (Lyon) a débuté, à la même période, son étude clinique sur 10 patients Alzheimer (score MMSE =  $24 \pm 3,8$ ), 11 aMCI (score MMSE =  $25,8 \pm 3$ ) et 21 sujets sains (score MMSE =  $29,8 \pm 0,4$ ) avec une analyse différente (Truchot et al., 2007). En effet, compte tenu de l'atrophie hippocampique importante constatée dans la MA, l'équipe lyonnaise a appliqué une correction de volume partiel ("partial volume effect" correction) à la fixation hippocampique du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF. Cette correction de volume partiel a été démontrée nécessaire dans des cas de perte volumique importante (Costes and Reilhac, 2006; Samuraki et al., 2006). De manière remarquable, les patients aMCI ont montré une fixation hippocampique du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF accrue comparativement au groupe de sujets sains alors que le groupe de patients Alzheimer a lui présenté une diminution significative de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF comparativement au groupe de sujets sains (**Fig. 44**).





**Figure 44.** Images TEP, représentatives des groupes étudiés, obtenues après injection de [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF chez un sujet témoin (apparié en sexe et en âge), un sujet MCI et un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Les flèches bleues indiquent l'augmentation significative de la fixation du radiotraceur (d'après [Truchot et al., 2007](#)).

L'interprétation proposée fut tout à fait différente de celle mise en avant par l'équipe de UCLA, puisque les valeurs de BPc ("binding potential" ou potentiel de liaison corrigé) résultantes devenaient indépendantes de l'atrophie. Ils ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la densité de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> au stade aMCI pourrait être le reflet de mécanismes compensatoires, précocement mis en jeu au cours de l'évolution de la MA et dépassés à un stade plus avancé.

## B. Objectifs

Compte tenu de la difficulté d'interprétation des résultats obtenus en clinique, mon objectif est d'explorer la neurotransmission sérotoninergique par imagerie TEP préclinique au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, dans un modèle d'injection de peptides amyloïdes chez le rat, afin d'évaluer sa capacité à reproduire une augmentation transitoire de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

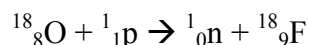
Un second objectif, complémentaire, réside dans l'évaluation des conséquences de l'injection de ces peptides sur la neuroanatomie au cours du temps, afin d'apporter des éléments de réponses aux mécanismes compensatoires pouvant être stimulés.



## C. Matériels et Méthodes

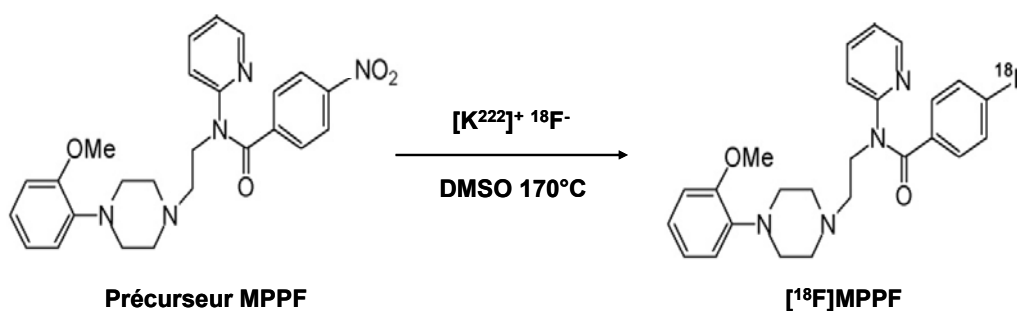
### 1. Les radiosynthèses

Le fluor 18 est produit grâce au cyclotron par la réaction (p,n) sur une cible d'eau enrichie en oxygène 18:



Le fluor 18 est obtenu sous sa forme fluorure ( $^{18}\text{F}^-$ ) puis est concentré sur une cartouche d'extraction en phase solide type QMA, ce qui permet, par ailleurs, de recycler l'eau enrichie ayant servi à sa production. Les radiosynthèses au fluor 18 sont effectuées à l'aide d'un automate de fluoration type FDG (Coïncidence<sup>TM</sup>, Bioscan®, USA).

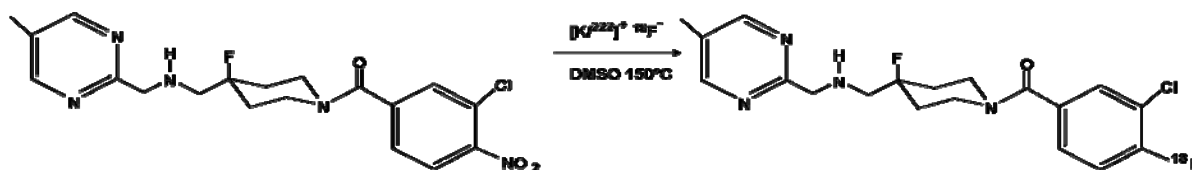
#### a. La radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$



**Figure 45.** Schéma de la réaction de radiosynthèse du  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ .

Le fluor est d'abord rendu anhydre avant la réaction de radiomarquage qui consiste en une substitution nucléophile en présence d'un catalyseur, le Kryptofix 2.2.2, à  $170^\circ\text{C}$  dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (**Fig. 45**) pendant 10 minutes ([Le Bars et al., 1998](#)). Une pré-purification de ce produit sur colonne est réalisée afin d'éliminer les matières hydrophiles, puis une chromatographie liquide haute performance (HPLC) est effectuée afin de purifier le radiopharmaceutique. Le  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  est finalement collecté, conditionné en vue d'une administration par injection et contrôlé pharmaceutiquement (HPLC avec détecteur UV et de radioactivité). Le radiotraceur est ainsi obtenu avec de bons rendements (20-25% EOS), une activité spécifique importante ( $>50 \text{ GBq} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ) ainsi qu'une excellente pureté chimique (99%).

## b. La radiosynthèse du [ $^{18}\text{F}$ ]F15599



**Figure 46.** Schéma de la réaction de radiosynthèse du [ $^{18}\text{F}$ ]F15599.

Le précurseur nitré du F15599 a été synthétisé par les laboratoires Pierre Fabre. Le radiomarquage par substitution nucléophile au fluor 18 du précurseur, est réalisé par un automate de synthèse standard Coïncidence reprogrammé (GE Mx). La réaction de radiomarquage a lieu en présence d'un catalyseur, le Kryptofix 2.2.2, à 150°C dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (**Fig. 46**). Une pré-purification de ce produit sur colonne est réalisée afin d'éliminer les matières hydrophiles, puis une chromatographie liquide haute performance (HPLC) est effectuée afin de purifier le radiopharmaceutique. Le [ $^{18}\text{F}$ ]F15599 est finalement collecté, conditionné en vue d'une administration par injection et contrôlé pharmaceutiquement (HPLC avec détecteur UV et de radioactivité). Le radiotracer est ainsi obtenu avec une activité spécifique importante (40 – 85 GBq. $\mu\text{mol}^{-1}$ ) ainsi qu'une excellente pureté chimique (>98%).

## 2. Les animaux

Des rats mâles adultes, de souche Sprague-Dawley (Charles River, France), pesant  $250 \pm 100$  g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C), d'humidité (50%) et de luminosité (lumière artificielle de 7h00 à 19h00), avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Une phase d'acclimatation minimale de 3 jours est observée entre le jour d'arrivée des animaux et le jour de l'expérimentation.

## 3. L'anesthésie

Les procédures expérimentales de relativement courte durée (<2 heures environ), effectuées chez les rats, sont réalisées à l'aide d'un mélange équimolaire de kétamine (kétamine 1000,

Virbac, France) et de xylazine (Rompum 2%). Le mélange préparé extemporanément est administré par voie intrapéritonéale à une dose de  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  de poids corporel pour la kétamine et  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de poids corporel pour la xylazine. Le choix de cette méthode d'anesthésie est motivé par la durée de l'endormissement limité (45-60 min), la rapidité de la récupération (35 min), la facilité d'utilisation et la tolérance chez l'animal.

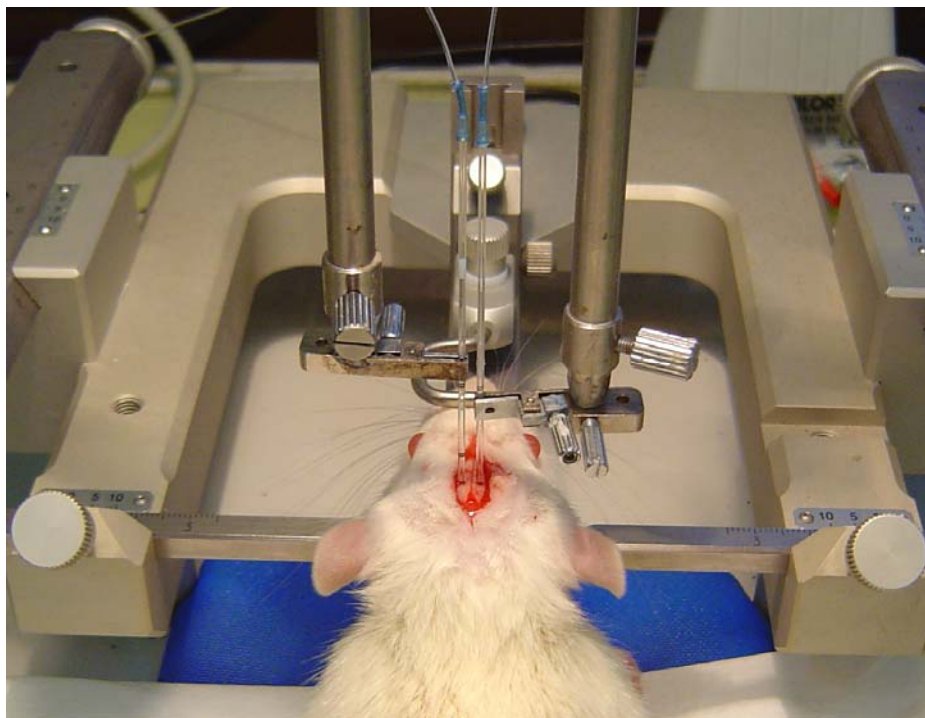
## 4. Les modèles animaux

### a. *La perfusion intrahippocampique de peptides A $\beta$ (1-40) ou (1-42)*

#### ♦ La préagrégation des peptides amyloïdes

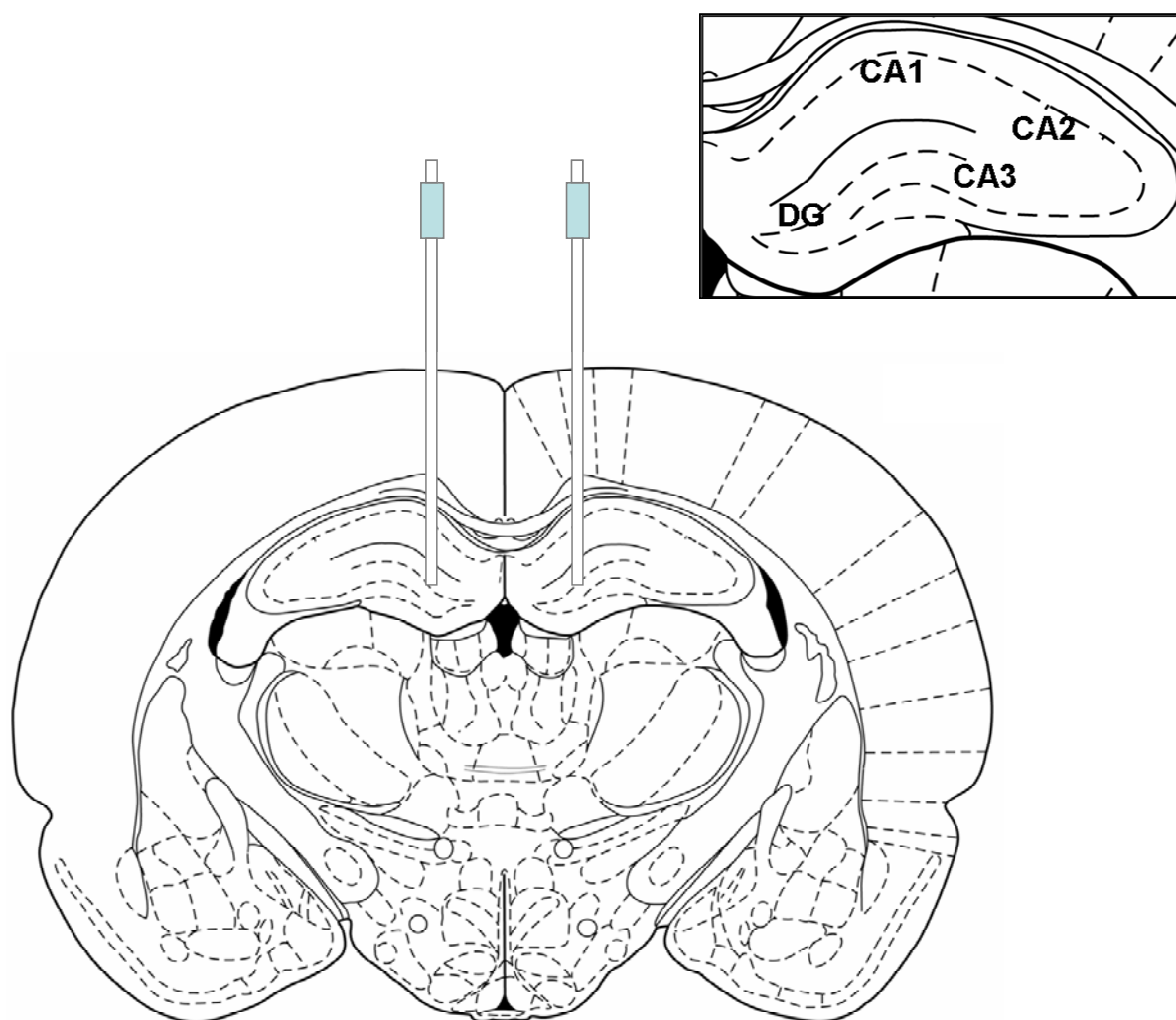
Les peptides A $\beta$  sont préparés à la concentration de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du NaCl 0,9% pour la forme A $\beta$  (1-40) et dans de l'eau distillée pour la forme A $\beta$  (1-42). Des aliquots de  $100 \mu\text{L}$  sont stockés à  $-80^\circ\text{C}$ . Les peptides A $\beta$  sont pré-agrégés par incubation de 3 jours minimum à  $37^\circ\text{C}$  avant leur utilisation ([Wu et al., 2007](#)).

#### ♦ L'injection des peptides amyloïdes



**Figure 47.** Photographie d'un rat anesthésié, stéréotaxiquement implanté avec des pipettes en verres reliées à un pousse-seringue et pouvant perfuser des peptides amyloïdes ou leur milieu de dilution, dans le gyrus denté de l'hippocampe dorsal.

Le rat anesthésié est placé en décubitus ventral sur la table de stéréotaxie (Stoelting, USA). Il est immobilisé et calé grâce à deux barres d'oreilles logées dans le méat auditif et à une barre d'incisives permettant le maintien de la mâchoire. Une incision allant de la région frontale à la région occipitale est réalisée, exposant les sutures coronales, sagittales et transversales. La surface crânienne osseuse est soigneusement ruginée et asséchée, puis les points bregma et lambda sont visualisés. Le trou de trépan, localisé selon les coordonnées stéréotaxiques à partir du bregma, est effectué à l'aide d'une fraise de dentiste, sans endommager le cerveau. Puis les méninges sont délicatement percées à l'aide d'une aiguille. Les coordonnées de localisation des pipettes en verres étirées dans les régions d'intérêt sont déterminées à partir de l'atlas de Paxinos et Watson (1986) (Fig. 47).



**Figure 48.** Schéma d'implantation des pipettes de perfusion des peptides  $A\beta$  dans le gyrus denté de l'hippocampe dorsal de rat.

Les coordonnées d'implantation des pipettes dans le gyrus denté de l'hippocampe dorsal sont: AP est de -3,2 mm, ML sont de  $\pm 1,2$  mm et DV est de -3,6 mm (Stéphan et al., 2001) (**Fig. 48**). Ces pipettes en verres sont reliées à un pousse-seringue (CMA/Microdialysis) qui permet de délivrer les solutions de perfusion à un débit de  $1 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ , assez faible pour limiter les dommages mécaniques portés au tissu cérébral. Le volume de solution injecté est de  $10 \mu\text{L}$  (soit  $1 \mu\text{g}$  de peptides  $\text{A}\beta$ ) sur une période de 10 min. Une pause de 2 min est observée pour permettre au volume perfusé de stagner sur le site précis d'injection visé. Puis les pipettes sont rehaussées dorsalement en 3 étapes d'un millimètre avec observation d'une pause d'une minute entre chaque étape. Le rat est ensuite suturé à l'aide de fils de suture stériles (Ethicon), le champ opératoire est désinfecté (Bétadine dermique 0,1%) puis un anesthésique local (lidocaïne) est appliqué.

### ***b. La perfusion intracérébroventriculaire (i.c.v.) de peptides $\text{A}\beta$ (25-35)***

Ce modèle d'injection i.c.v. de peptides  $\text{A}\beta$  (25-35) a été réalisé par le Dr Sandor Arancibia de l'Université de Montpellier 2 (INSERM U710 et EPHE).

#### **♦ La préparation des peptides amyloïdes**

Les peptides  $\text{A}\beta$  (25-35) et les peptides  $\text{A}\beta$  (25-35)<sub>scramble</sub> ("scramble" correspond à un ordre mélangé des acides aminés) (Bachem, Germany), sont dissous dans de l'eau distillée stérile ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). La préagrégation consiste en une incubation de 4 jours à  $37^\circ\text{C}$  (Maurice et al., 1996).

#### **♦ L'injection des peptides amyloïdes**

La préparation du rat anesthésié sur l'appareil stéréotaxique est la même que celle effectuée pour le modèle d'injection de peptides  $\text{A}\beta$  (1-40).

Les coordonnées d'implantation stéréotaxique dans les ventricules latéraux par rapport au Bregma sont les suivantes: 0,8 mm selon l'axe AP, 1,5 mm selon l'axe ML et 3,8 mm selon l'axe DV (Stepanichev et al., 2006). Le volume des peptides  $\text{A}\beta$  (25-35) agrégés injectés est de  $5 \mu\text{L}$  par ventricule latéral, à un débit de  $1 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ . Il en est de même pour les peptides  $\text{A}\beta$  (25-35)<sub>scramble</sub>. Les rats sont bétadinés et suturés. Un délai de 30 jours est observé avant les études autoradiographiques au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF.

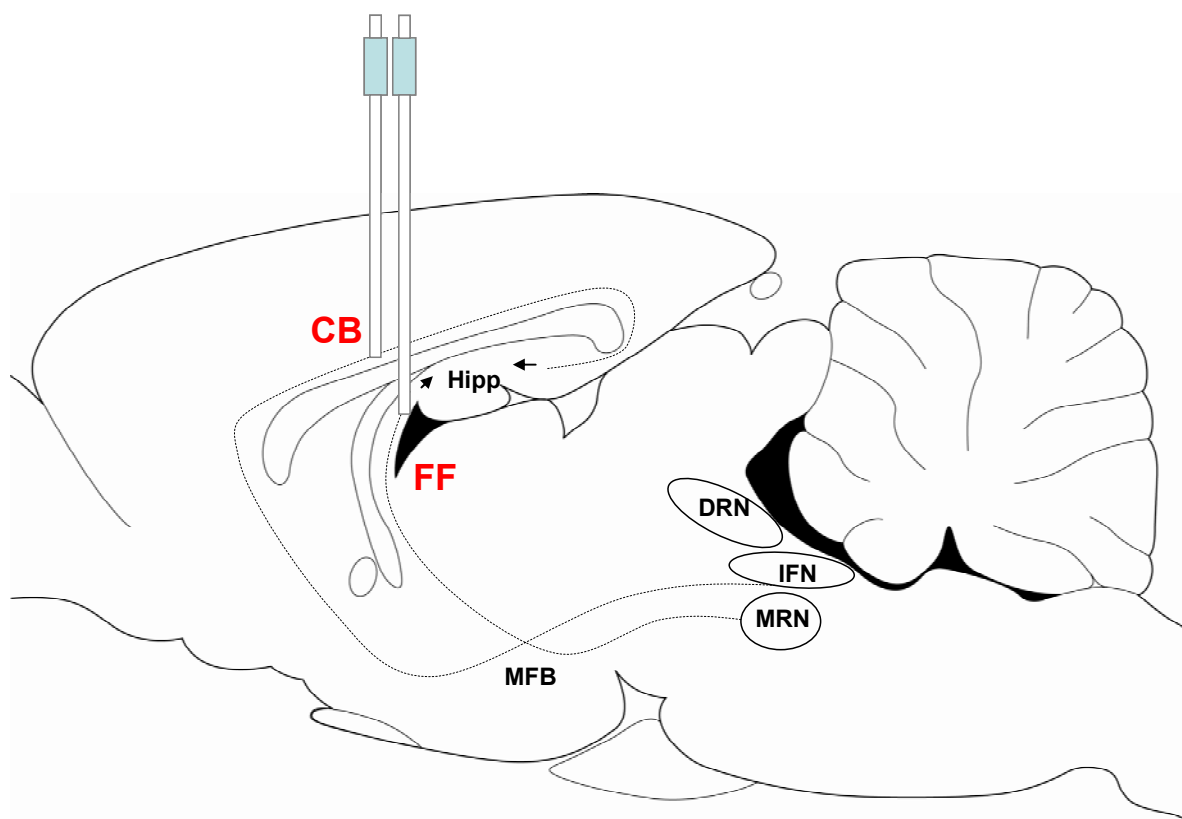
### c. *L'injection d'une neurotoxine sérotoninergique (5,7 DHT)*

#### ♦ La préparation de la neurotoxine

La neurotoxine 5,7 dihydroxytryptamine (5,7 DHT) est préparée le jour même de l'injection à la concentration de  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dans du NaCl 0,9% avec 0,02% d'acide ascorbique. Le rat est préalablement traité avec de la désipramine, un inhibiteur sélectif de la recapture de noradrénaline, à la dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  intrapéritonéalement, 30 minutes minimum avant la lésion. Ce prétraitement permet de protéger les fibres noradrénergiques de la neurotoxine.

#### ♦ L'injection de la neurotoxine

La préparation du rat anesthésié sur l'appareil stéréotaxique est la même que celle effectuée pour le modèle d'injection de peptides A $\beta$  (1-40).



**Figure 49.** Schéma représentant les pipettes d'injection de la neurotoxine implantées dans les faisceaux d'innervation sérotoninergique de l'hippocampe dorsal du rat. CB: cingulum bundle; FF: fimbria fornix; IFN: interfascicular nucleus; MRN: median raphe nucleus; DRN: dorsal raphe nucleus; MFB: medial forebrain bundle (d'après [Zhou et Azmitia, 1983](#)).

Les coordonnées stéréotaxiques sont ciblées avec un angle de  $75^\circ$  par rapport à la surface crânienne et sont les suivantes ([Patel et al., 1996](#)). La coordonnée AP est de -1,0 mm,

les coordonnées ML sont de  $\pm 1,3$  mm et celle DV de  $-2,4$  mm pour le faisceau cingulaire (CB pour "cingulate bundle") et  $-4,5$  mm pour le fimbria fornix (FF) (**Fig. 49**). Les pipettes en verre sont reliées à un pousse-seringue délivrant la neurotoxine à un débit de  $0,1 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  sur une durée de 4 min soit  $0,4 \mu\text{L}$  ( $5 \mu\text{g}$  de neurotoxine) par structure visée. Une pause de 2 minutes est observée après l'injection sur chacun des sites, puis 1 minute par millimètre lors de la rétraction des pipettes. Le rat est ensuite suturé puis traité avec un antiseptique local et un anesthésique local (comme décrit précédemment).

#### ***d. Le traitement à la pCPA, inhibiteur de la synthèse de sérotonine***

La pCPA ou 4-chloro-DL-phénylalanine éthyler hydrochloride (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur de la tryptophane hydroxylase, enzyme qui intervient dans la synthèse de la sérotonine. Le traitement consiste à injecter quotidiennement  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (i.p.) de pCPA sur une durée de 5 jours ([Compan et al., 1998](#)). Le rat est euthanasié au dernier jour du traitement, 2 heures au minimum après la dernière injection.

### **5. L'imagerie microPET chez le rat**

L'examen d'imagerie microPET a été réalisé avec la caméra "ClearPET LYSO/LuYAP Phoswich scanner" (Raytest, Allemagne) en mode tridimensionnel d'acquisition. Le diamètre de l'anneau est de 15 cm. La résolution spatiale est de 1,25 mm au centre du champ de vue, de 1,5 mm à 10 mm du centre, et de 2,0 mm au-delà. En position axiale, le maximum de sensibilité est de 3,8%.

Le rat anesthésié à l'isoflurane (4% pendant 2 min puis 2%) est placé en décubitus ventral sur le lit du tomographe. Un cathéter est inséré dans une veine latérale de la queue. Il est fixé dans un système de contention (mousse + adhésif) permettant un positionnement stable de la tête de l'animal sous la caméra microTEP. Un système de guidage laser permet de centrer le cerveau du rat dans le champ de vue. Un scanner de transmission est réalisé pendant 15 min avec des sources linéaires de germanium ( $^{68}\text{Ge}$ ) tournant autour du cerveau du rat. Le  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  est injecté en bolus de  $9,7 - 16,2 \text{ MBq}$  via la veine latérale de la queue et l'acquisition dynamique dure 45 min.

Les sinogrammes obtenus sont reconstruits de la manière suivante: une image est constituée toutes les 30 sec des 5 premières minutes (10 images), toutes les minutes de 5 à 10 min (soit 5 images), toutes les 2 min de 10 à 20 min (soit 5 images) puis toutes les 5 min de 20 à 45 min (soit 5 images). Au total, 25 images dynamiques sont reconstruites et analysées avec le logiciel Amide (A Medical Imaging Data Examiner, licence gratuite). Les régions d'intérêts (hippocampe dorsal et cervelet) sont tracées manuellement avec l'aide de l'atlas stéréotaxique du rat (Paxinos et Watson, 1986). Après normalisation, les courbes d'activités temporelles pour chaque région sont exprimées en MBq.cm<sup>-3</sup>.

## 6. L'autoradiographie

### a. L'autoradiographie *in vitro*

Lorsque les rats des différents modèles arrivent à leur "maturité", ils sont euthanasiés par décapitation après un "anesthésie-flash" à l'isoflurane. Le cerveau est prélevé, rincé dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à -30°C par l'ajout de carboglace. Les cerveaux sont, soit conservés à -80°C, soit directement utilisés. Des coupes coronales de 30 µm de diamètre sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm Microtech, France) à -20°C, dans les régions d'intérêts avec l'aide d'un atlas stéréotaxique du rat (Paxinos et Watson, 1986), puis fixées par adhérence sur des lames de verres sèches (Starfrost®). Chaque lame comporte deux coupes du cerveau d'un rat traité (ou injecté) et deux coupes, dans la même structure cérébrale, du cerveau d'un rat témoin. Cette disposition permet aux deux populations d'avoir les mêmes conditions expérimentales, et facilite la comparaison lors de l'analyse. Les lames sont ensuite conservées quelques jours à -80°C avant les expériences d'autoradiographie. Le jour où la radiosynthèse est programmée, les lames congelées au -80°C sont placées à température ambiante durant 30 minutes. Elles sont ensuite incubées durant 20 minutes, à température ambiante, dans 50mM du tampon TBS-HCl pH 7,5 (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, Sigma-Aldrich, France) contenant 1 µCi.mL<sup>-1</sup> du radiotracer fluoré ([<sup>18</sup>F]MPPF ou [<sup>18</sup>F]F15599) ou durant 60 minutes dans du tampon TBS-HCl pH 7,5 contenant 1 µCi.mL<sup>-1</sup> de [<sup>11</sup>C]PIB. La fixation non-spécifique des radiotraceurs sérotoninergiques est déterminée par l'ajout de sérotonine en excès dans le bain d'incubation (10 µM). Les lames sont lavées 90 secondes dans 50 mM du tampon TBS-HCl pH 7,5 à 4°C puis 90 secondes dans de l'eau distillée à 4°C avant d'être séchées par un léger flux d'air ambiant. Les lames sont apposées contre les écrans ou films du phosphor-imageur



(BAS 1800 II, Fujifilm) pendant 60 minutes dans une cassette. Puis les images sont révélées en quelques minutes par le logiciel "Image Reader". Le logiciel d'analyse d'images "Multigauge" permet une analyse semi-quantitative de la fixation de nos radiotraceurs, dans les régions d'intérêts manuellement tracées à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau du rat (Paxinos et Watson, 1986). Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en  $\text{psl.mm}^{-2}$ . Elles sont comparées entre les coupes de cerveaux de rats traités et celles de rats témoins.

### ***b. L'autoradiographie ex vivo***

Notre planning est adapté de manière à ce que les rats des différents modèles arrivent "à échéance" le jour de la radiosynthèse. Ils sont anesthésiés intrapéritonéalement à l'uréthane ( $1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) puis un cathéter est introduit au niveau d'une veine latérale de la queue. L'injection en bolus de 55,5 MBq du radiotraceur est réalisée. Les rats sont euthanasiés par décapitation 20 minutes après l'injection du radiotraceur. Le cerveau est prélevé, rincé dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à  $-30^{\circ}\text{C}$  par l'ajout de carboglace. Des coupes coronales de  $30 \mu\text{m}$  sont réalisées au cryostat (Microm Microtech, France) à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans les structures d'intérêts à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau du rat (Paxinos et Watson, 1986) puis fixées par adhérence sur des lames de verres sèches (Starfrost®). Comme pour les expériences *in vitro*, chaque lame comporte deux coupes du cerveau d'un rat traité et deux coupes du cerveau d'un rat témoin dans la même région cérébrale. Les lames séchées à température ambiante suivent ensuite la procédure décrite pour l'autoradiographie *in vitro*.

## **7. Le dosage tissulaire de la sérotonine**

Les rats des différents modèles arrivés "à échéance" sont euthanasiés par décapitation, leur cerveau est prélevé puis placé dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Le cortex cingulaire (Cing), l'hippocampe dorsal (Hipp Dors), l'hippocampe ventral (Hipp Ventr), le noyau du raphé dorsal (NRD) et le cervelet (Cereb), sont disséqués manuellement dans du tampon TBS-HCl (pH 7,5) froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ), précisément pesés, puis congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant leur utilisation. Les échantillons tissulaires sont broyés, soniqués dans  $5 \mu\text{L}$  (par mg de tissus) d'acide perchlorique ( $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ ), puis centrifugés à  $5000 \text{ tr.min}^{-1}$  pendant 10 min. Le surnageant est neutralisé dans une solution d'acétate de potassium ( $1,5 \mu\text{L}$  par mg de tissus)

puis filtré (0,45 µm) avant analyse par HPLC ("high performance liquid chromatography" en anglais). Le système HPLC est composé d'une colonne chromatographique C-18 en phase inverse (Lichrosorb, 5 µm, 250 x 4,6 mm) avec la phase mobile suivante: 0,005 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 8% d'acétonitrile à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Un détecteur de fluorescence Merck Lachrom (280 nm excitation, 320 nm émission) est utilisé. Dans nos conditions expérimentales, le temps de rétention de la sérotonine est de 5,7 min et la limite de détection d'environ 1 nM.

## **8. La neuroanatomie**

### ***a. La perfusion***

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital (50 mg.kg<sup>-1</sup> i.p.) et rapidement perfusés, par voie intracardiaque, avec 200 mL d'une solution de NaCl 0,9% contenant 0,1% d'héparine (Choay, France), puis avec 500mL d'une solution de paraformaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich, France) dissous dans du tampon phosphate (PB) 0,1M, pH 7,4. Le cerveau est ensuite prélevé et post-fixé une nuit à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4%, puis placé dans du PB 0,1M, pH 7,4 contenant 30% de saccharose (Fuka, France) pendant 36 à 48 heures à 4°C, afin de permettre la cryoprotection du tissu. Le cerveau est congelé dans une solution d'isopentane (2-méthyl-butane 99%; Sigma-Aldrich, France) à -30°C pendant 10 minutes, puis conservé à -20°C entouré de parafilm. Des coupes coronales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C. Les sections sont collectées dans du PB 10 mM, pH 7,4 contenant 0,9% de NaCl (PBS) et 0,1% d'azide de sodium (Merck, France). Elles sont conservées à 4°C.

### ***b. L'histochimie***

#### **♦ La coloration rouge neutre**

Les coupes sont montées sur lames gélatinées et séchées à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Après un passage rapide dans de l'eau distillée, elles sont à nouveau séchées à température ambiante pendant 30 minutes. Les lames sont plongées dans une solution mère de rouge neutre à 1%, pH 4,8 (Merck, France) pendant 1 minute et 20 secondes. L'excès de colorant est lavé par 2 bains d'une minute chacun dans de l'eau distillée. Les coupes sont déshydratées par une succession de bains d'éthanol de concentrations croissantes (75%, 95%, 95%, 100%, 100%) pendant une minute chacun. Un premier bain de méthylcyclohexane de 40 secondes, suivi par un bain d'une minute, permettent d'éliminer

l'éthanol et d'éclaircir les coupes. Les lames sont ensuite montées sous lamelles avec du Depex (Gurr, UK) comme milieu de montage.

#### ♦ La coloration rouge congo

Les coupes sont montées sur lames gélatinées et séchées à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Après un passage rapide dans de l'eau distillée, elles sont de nouveau laissées séchées à température ambiante pendant 30 minutes. Les lames sont plongées 1 minute 20 secondes dans une solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich, France). L'excès de colorant est lavé par deux bains successifs d'eau distillée, d'une minute chacun. Les coupes sont ensuite plongées dans une solution de chlorure de sodium (Congo red kit, Sigma-Aldrich, France) pendant 20 minutes puis dans la solution de rouge congo (Congo red kit, Sigma-Aldrich, France) pendant 20 minutes. Les coupes sont déshydratées par une succession de bains d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 80%, 90%, 100%) d'une minute chacun puis plongées dans deux bains successifs de méthylcyclohexane d'une minute. Les lames sont montées sous lamelles avec du DPX (Fisher-Bioblock, France) comme milieu de montage.

### **c. L'immunohistochimie**

#### ♦ Le principe général

Le protocole que nous avons utilisé est basé sur l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques révélés par la méthode avidine-biotine (le système avidine-biotine est un système d'amplification du signal permettant de détecter des quantités d'antigène trop faibles pour être appréhendées par les systèmes enzymatiques directs). Il est associé à la peroxydase du raifort et à un substrat chromogène. Nous avons utilisé comme chromogène la 3-3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) qui induit une coloration brune. La DAB peut être associée au chlorure de nickel ( $\text{NiCl}_2$ ) pour induire une coloration bleue-noire. Nous avons privilégié cette association plutôt que la méthode peroxydase anti-péroxydase car elle permet d'obtenir une meilleure sensibilité ainsi qu'un bruit de fond moins important.

#### ♦ Le marquage de la protéine gliale fibrillaire acide (ou GFAP pour "glial fibrillar acidic protein")

Toutes les réactions suivantes ont été réalisées à température ambiante, sous agitation pour les lavages et les incubations. Les coupes de cerveau subissent trois lavages de 10 minutes dans du PBST (10mM PB, 0,9% NaCl, 0,3% Triton X 100). Elles sont incubées une nuit dans une solution d'anticorps primaire dirigés contre la GFAP (rabbit polyclonal GFAP; Dako,

Carpinteria, CA) dilué au 1/2000 dans du PBST contenant 1% de sérum albumine bovine (BSA). Trois lavages de 10 minutes dans du PBST sont suivis par une incubation de 90 minutes dans une solution d'anticorps secondaire biotinylé anti-lapin (goat anti-rabbit biotin) dilué au 1/1000 dans du PBST. Puis trois lavages des coupes dans du PBST sont réalisés. Une incubation de 60 minutes est faite dans une solution d'avidine (A; 0,5%) et biotine (B; 0,5%) conjuguée à une peroxydase (Elite ABC Kit, Laboratoires Vector) dans du PBST. Enfin, trois lavages dans du PBST sont effectués. La révélation est obtenue par une incubation des coupes pendant 4-5 minutes dans un tampon Tris-HCl (50mM, pH 7,4) contenant 0,003% de peroxyde d'hydrogène, 0,02% de DAB et 0,08% de chlorure de nickel. Deux lavages de 5 min dans du PBST sont réalisés. Les coupes sont ensuite montées sur des lames gélatinées et laissées séchées à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Elles sont montées sous lamelles avec du Depex (Gurr, UK) comme milieu de montage.

#### ♦ Le marquage de la sérotonine

Le protocole de marquage à la sérotonine est identique à celui du marquage à la GFAP excepté pour les étapes suivantes. L'anticorps primaire de souris dirigé contre la sérotonine (gracieusement donné par Yves Charnay) est dilué au 1/200000 dans du PBST contenant 1% de BSA. L'anticorps secondaire biotinylé anti-souris est dilué au 1/1000 dans du PBST. La révélation est obtenue en 3 minutes environ.

### ***d. L'hybridation in situ***

#### ♦ Le principe général

Cette technique permet de visualiser, sur une coupe histologique, les cellules dans lesquelles s'expriment un certain type d'ARN messager (ARNm). Elle est basée sur la production de sonde d'ARN antisens marquée, pouvant s'hybrider sur les ARNm issus de la transcription d'un gène connu. La sonde, hybridée aux ARNm, peut être révélée chimiquement.

#### ♦ Le marquage de l'ARNm du transporteur du glutamate de type 1 (VGLUT1)

Pour réaliser ce marquage, les coupes sont prélevées de manière stérile et stockées à -20°C dans un milieu cryoprotecteur. Les coupes sont lavées 3 fois 10 minutes dans du tampon 2 SSC contenant 2 µL d'un inhibiteur des RNase, puis incubées une nuit à 65°C dans du tampon d'hybridation contenant 0,25 µg.mL<sup>-1</sup> de sonde VGLUT1 marquée à la dioxynine. Les coupes sont hybridées dans des plaques Nunc stériles placées dans une chambre humide

sous agitation. Deux lavages à 65°C pendant 20 minutes dans du 2SCC avec 50% formamide sont réalisés. Les coupes sont incubées 15 minutes à 37°C dans une solution contenant 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de RNase A dans du tampon Tris 10 mM pH 7,4 avec 1 mM d'EDTA et 500 mM de NaCl. Trois lavages de 10 minutes à température ambiante sous agitation sont effectués dans du PBST. Les coupes sont incubées une nuit à température ambiante avec l'anticorps de mouton anti-dioxygénine marqué à la phosphatase alcaline et dilué au 1/2000 (Roche-Bohringer). Deux lavages de 10 minutes dans du PBST sous agitation et à température ambiante sont réalisés. Après un passage dans le tampon de révélation (Tris HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  50 mM), la révélation est réalisée, à l'abri de la lumière à 37°C, dans du tampon de révélation contenant 20  $\mu\text{L}$  de NBT/BCPIP (Roche). Les coupes sont ensuite lavées 10 minutes dans du tampon de révélation puis 3 fois 10 minutes dans un grand volume de PBST à température ambiante. Le montage des coupes se fait sur des lames gélatinées laissées séchées 30 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite passées dans de l'eau distillée puis à nouveau séchées à température ambiante. Après un court passage dans du méthylcyclohexane, les coupes sont montées sous lamelles avec du Vectamount (AbCys, France) comme milieu de montage pour l'observation au microscope.

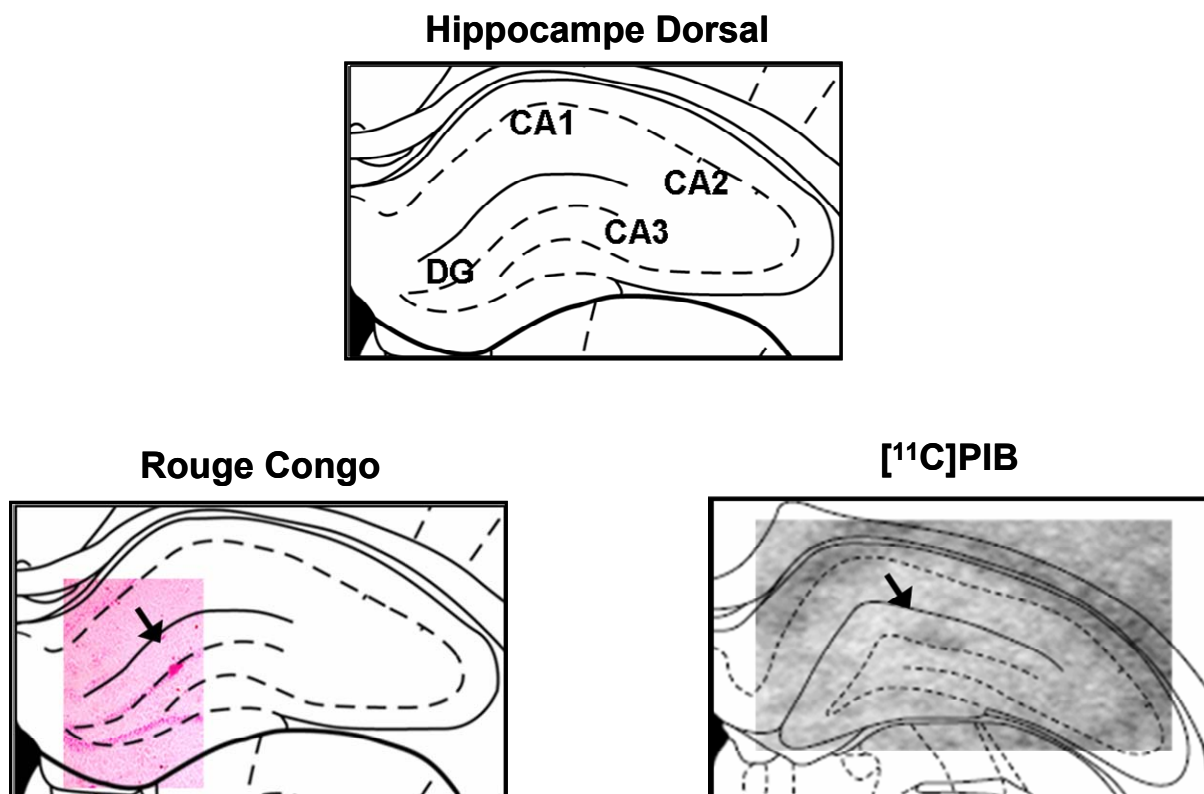
## D. Résultats

### 1. Le modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$ (1-40)

#### a. Délai post-injection = 7 jours

##### ♦ La validation du modèle

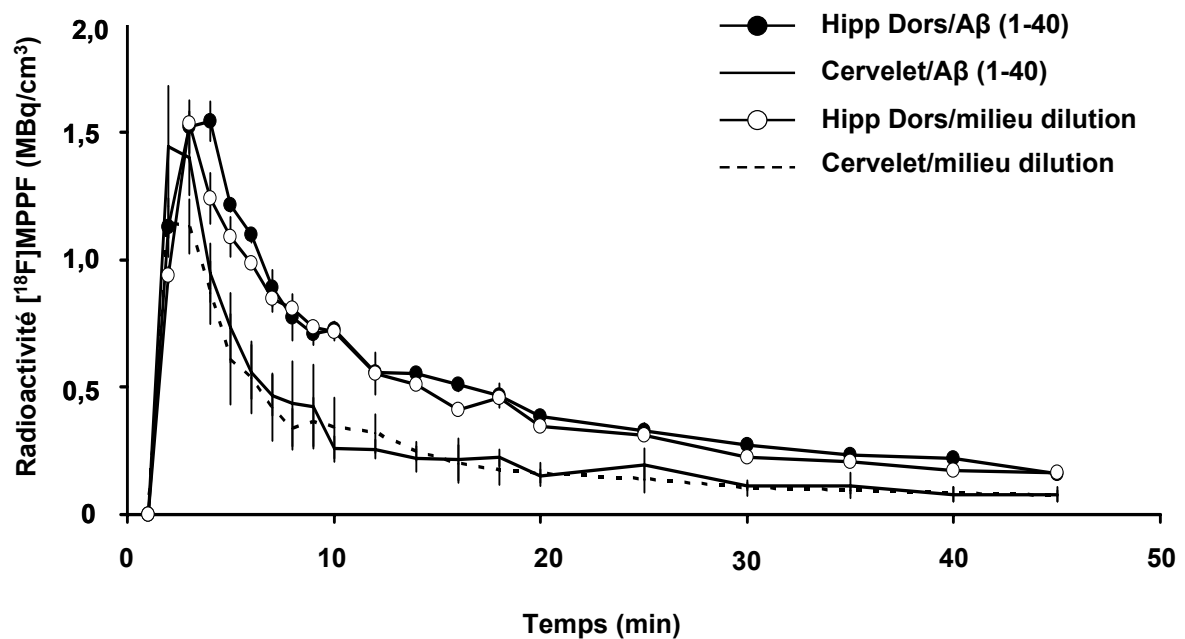
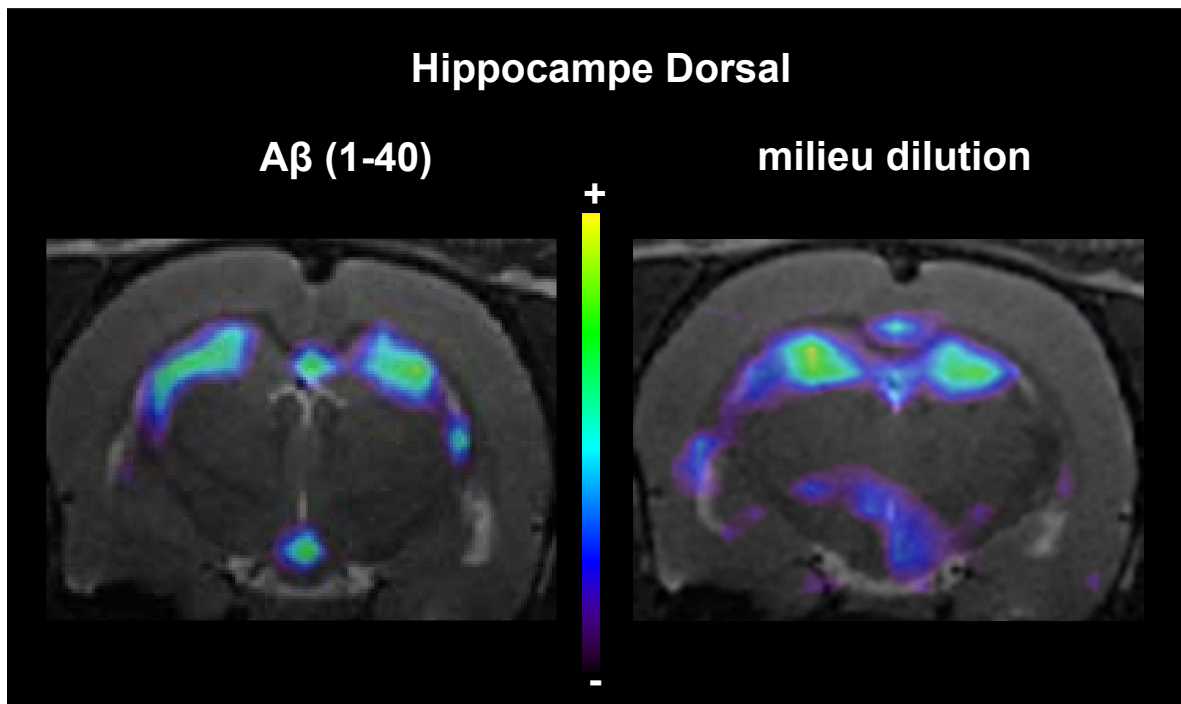
L'injection intrahippocampique des peptides A $\beta$  (1-40) cible le gyrus denté (DG) bilatéralement. Une agrégation de peptides amyloïdes est mise en évidence par marquage au rouge congo, 7 jours après l'injection des peptides (**Fig. 50**). On peut noter qu'elle est également visible sur une coupe adjacente, par marquage autoradiographique *in vitro* au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (**Fig. 50**).



**Figure 50.** Schéma représentant les sous régions de l'hippocampe dorsal de rat injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) agrégés. Nous contrôlons la présence de peptides A $\beta$  (1-40) agrégés au niveau de la couche granulaire du gyrus denté par marquage histologique au rouge congo (flèche en bas à gauche) et par autoradiographie *in vitro* au [ $^{11}\text{C}$ ]PIB (flèche en bas à droite). Les différentes couches de l'hippocampe dorsal sont représentées: les cornes d'Amon 1, 2 et 3 (CA1, 2, 3) et le gyrus denté (DG) (en haut).

### ♦ L'imagerie microTEP

Les examens microTEP ont été réalisés 7 jours après l'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40) pré-agrégés (n = 4 rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40); n = 4 rats injectés avec le milieu de dilution seulement). Après l'injection intraveineuse du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, on observe un pic de radioactivité au niveau cérébral dans les premières minutes, rapidement suivi par une évacuation du traceur à des vitesses variables suivant la région analysée (**Fig. 51**). Les courbes de cinétique radioactive au niveau de l'hippocampe des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) atteignent un pic ( $1,54 \pm 0,07 \text{ MBq.cm}^{-3}$ ), 5 min après l'injection du traceur. Au niveau de l'hippocampe des rats injectés avec le milieu de dilution, ce pic est observé 3 min après l'injection du traceur ( $1,53 \pm 0,04 \text{ MBq.cm}^{-3}$ ). Les courbes cinétiques au niveau du cervelet sont très comparables entre les deux groupes de rats, avec un pic de radioactivité 1 min après l'injection du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF suivi par une diminution très rapide pour rejoindre un niveau de base. Au niveau de l'hippocampe dorsal, aucune différence significative de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF n'est observée entre des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) préagrégés et les rats injectés avec le milieu de dilution (**Fig. 51**).



**Figure 51.** Images microTEP au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau de l'hippocampe dorsal de rats injectés avec des peptides A $\beta$  (1-40) ( $n = 4$ ; en haut à gauche) ou avec du milieu de dilution ( $n = 4$ ; en haut à droite). Courbes cinétiques de radioactivité du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF (exprimées en MBq.cm $^{-3}$ ) au niveau de l'hippocampe dorsal (Hipp Dors) et du cervelet dans les deux groupes de rats (courbes en bas).



♦ L'autoradiographie *in vitro* au [<sup>18</sup>F]MPPF

Le niveau de fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF *in vitro* au niveau de l'hippocampe dorsal, 7 jours après l'injection intracérébrale des peptides Aβ (1-40) est significativement supérieur (+22,3%;  $p < 0,05$ ) à celui de l'hippocampe dorsal de rats injectés avec le milieu de dilution seulement ( $532 \pm 51$  psl.mm<sup>-2</sup> (n = 8) versus  $435 \pm 44$  psl.mm<sup>-2</sup> (n = 8)). Au niveau du DG, la différence est encore plus marquée et atteint +41,5% ( $p < 0,05$ ), avec une fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF de  $668 \pm 78$  psl.mm<sup>-2</sup> chez les rats injectés avec les peptides (n = 8) et de  $472 \pm 85$  psl.mm<sup>-2</sup> chez les rats injectés avec le milieu de dilution seulement (n = 8) (**Fig. 52**; les valeurs pour les autres régions de l'hippocampe dorsal y sont également reportées).

♦ L'autoradiographie *in vitro* au [<sup>18</sup>F]F15599

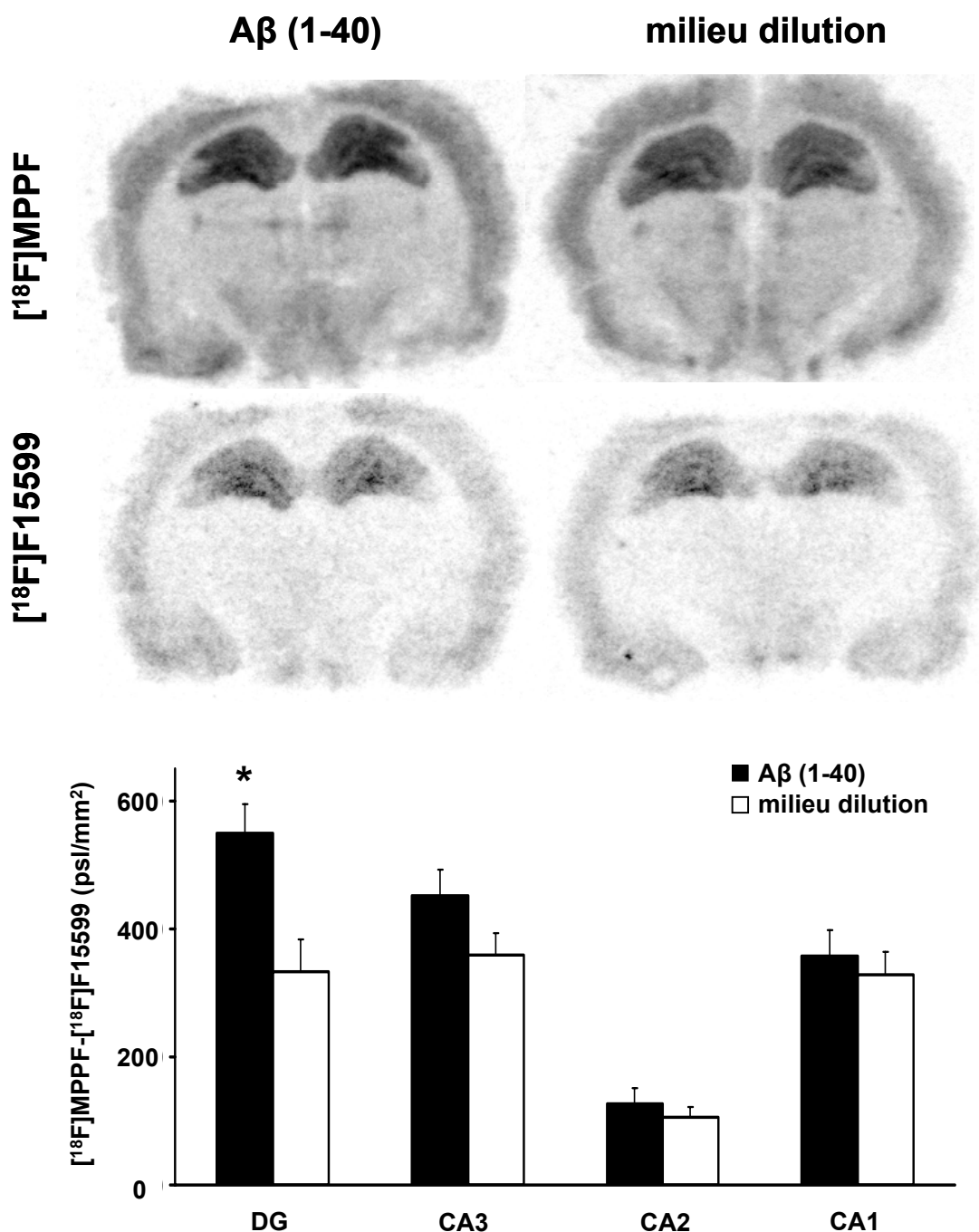
Sept jours après l'injection des peptides Aβ (1-40), les valeurs radioactives semi-quantitatives de fixation du [<sup>18</sup>F]F15599 *in vitro* au niveau du DG sont statistiquement comparables aux valeurs de radioactivité semi-quantitatives observées dans le groupe de rats injectés avec le milieu de dilution seulement ( $120 \pm 15$  psl.mm<sup>-2</sup> (n = 4) versus  $138 \pm 16$  psl.mm<sup>-2</sup> (n = 4)) (**Fig. 52**; les valeurs pour les autres régions de l'hippocampe dorsal y sont également reportées).

		[ <sup>18</sup> F]MPPF	[ <sup>18</sup> F]F15599
<b>DG</b>	<b>Aβ (1-40)</b>	<b>668 ± 78*</b>	<b>120 ± 15</b>
	<b>milieu dilution</b>	<b>472 ± 85</b>	<b>138 ± 16</b>
<b>CA3</b>	<b>Aβ (1-40)</b>	<b>548 ± 69</b>	<b>96 ± 12</b>
	<b>milieu dilution</b>	<b>453 ± 55</b>	<b>94 ± 12</b>
<b>CA2</b>	<b>Aβ (1-40)</b>	<b>156 ± 41</b>	<b>29 ± 8</b>
	<b>milieu dilution</b>	<b>135 ± 25</b>	<b>29 ± 8</b>
<b>CA1</b>	<b>Aβ (1-40)</b>	<b>442 ± 70</b>	<b>84 ± 9</b>
	<b>milieu dilution</b>	<b>413 ± 61</b>	<b>86 ± 12</b>

**Figure 52.** Valeurs radioactives semi-quantitatives de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF et du [<sup>18</sup>F]F15599 au niveau des sous-régions de l'hippocampe dorsal, 7 jours après l'injection des peptides amyloïdes Aβ (1-40) ou du milieu de dilution (valeurs exprimées en psl.mm<sup>-2</sup> ± SEM; \* représente  $p < 0,05$  au test t de Student).

♦  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF} - [^{18}\text{F}]\text{F15599}$

Les expériences d'autoradiographies *in vitro* ont toutes été menées dans les mêmes conditions expérimentales. Lorsque l'on soustrait les valeurs semi-quantitatives de radioactivité du  $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$  (population de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> couplés aux protéines G) à celles obtenues avec le  $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$  (population "totale" de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, couplés et non-couplés) au niveau du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, on obtient une approximation semi-quantitative de la population des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> non-couplés aux protéines G. Ainsi, dans le groupe de rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40), cette estimation est de  $548 \pm 46 \text{ psl.mm}^{-2}$ , soit significativement plus élevée (+64,6%;  $p < 0,05$  au test t de Student) que dans le DG du groupe de rats ayant subi une injection du milieu de dilution uniquement ( $333 \pm 50 \text{ psl.mm}^{-2}$ ) (**Fig. 53**).



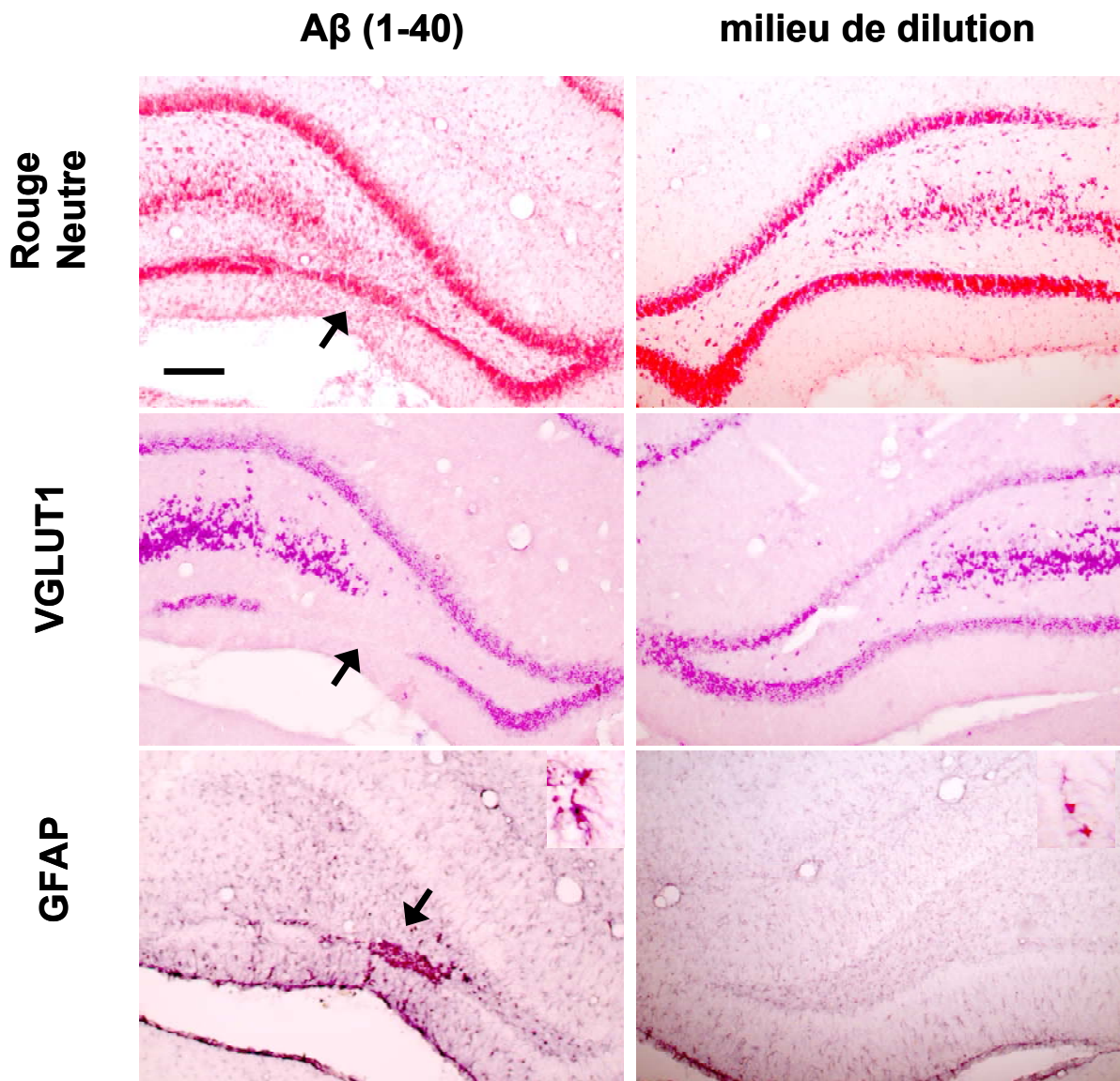
**Figure 53.** Autoradiographies *in vitro* au [<sup>18</sup>F]MPPF et [<sup>18</sup>F]F15599 au niveau de l'hippocampe dorsal de rats injectés 7 jours plus tôt, soit avec des peptides Aβ (1-40), soit avec le milieu de dilution (images en haut). Visuellement, on note un niveau d'intensité radioactive moindre, dans les cerveaux marqués avec l'agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ([<sup>18</sup>F]F15599 = population couplée aux prot G) par rapport à celle observée avec un traceur antagoniste de ces récepteurs ([<sup>18</sup>F]MPPF = population "totale"). Les histogrammes (en bas) représentent les différences d'intensité radioactive entre le [<sup>18</sup>F]MPPF et le [<sup>18</sup>F]F15599 au niveau des sous-régions de l'hippocampe dorsal de rats injectés avec les peptides amyloïdes ou avec leur milieu de dilution. Ces différences reflètent la population de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> non-couplés à leur prot G (\* correspond à p < 0,05 au test t de Student).

### ♦ La neuroanatomie

Le marquage histologique au rouge neutre, mettant en évidence le cytoplasme de toutes les cellules (neurones et cellules gliales), montre une réduction plus importante de l'épaisseur de la couche de cellules granulaires dans le gyrus denté de rats ayant été injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40), que chez des rats n'ayant reçu que le milieu de dilution (**Fig. 54**). De plus, la présence de cellules de petites tailles peut être distinguée au niveau de la couche granulaire du gyrus denté des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40).

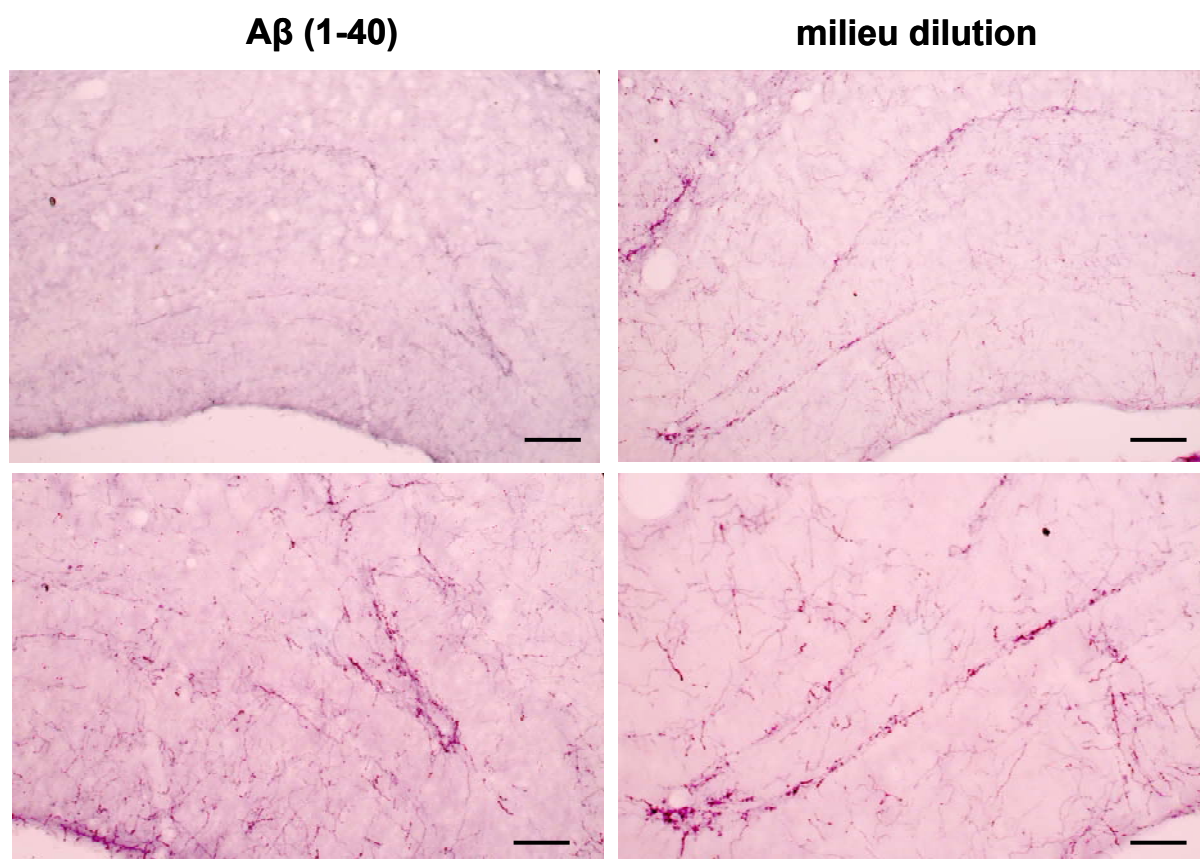
Sur des coupes adjacentes, l'hybridation *in situ* ciblant l'ARNm du transporteur glutamatergique de type 1 (VGLUT1) révèle une perte évidente de neurones granulaires de la couche du gyrus denté de rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40). Une absence de neurotoxicité glutamatergique est constatée chez les rats ayant reçu le milieu de dilution (**Fig.54**).

Le marquage immunohistochimique de la GFAP (pour "glial fibrillar acidic protein" en anglais) montre la présence d'une réaction astrocytaire intense à l'intérieur de la couche du gyrus denté et de sa proximité (CA3), chez des rats ayant été injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40). Chez les rats injectés avec le milieu de dilution, une réaction astrocytaire est présente, mais paraît beaucoup moins prononcée. En effet, les prolongements astrocytaires sont moins épais et les corps cellulaires des astrocytes moins volumineux (**Fig. 54**).



**Figure 54.** Images du marquage cellulaire (rouge neutre, en haut), des transporteurs glutamatergiques de type 1 (VGLUT1, hybridation in situ, au milieu) et de la réaction astrocytaire (immunohistochimie de la GFAP, en bas), au niveau du site d'injection (gyrus denté) des peptides  $A\beta$  (1-40) (à gauche) ou du milieu de dilution uniquement (à droite). Sur une même colonne, les coupes sont adjacentes. L'échelle micrométrique représente 200  $\mu\text{m}$ .

Le marquage immunohistochimique de la sérotonine dans l'hippocampe dorsal est identique entre des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) et ceux injectés avec le milieu de dilution (**Fig. 55**).

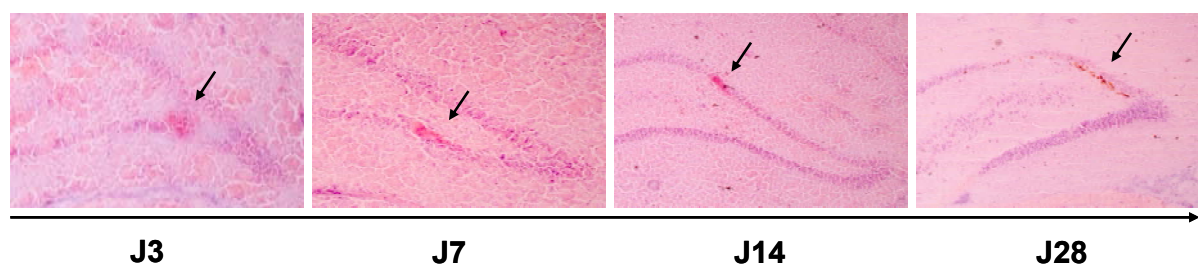


**Figure 55.** Exemples d'images du gyrus denté de rats marqués avec un anticorps dirigé contre la sérotonine, 7 jours après l'injection de peptides A $\beta$  (1-40) (à gauche) ou l'injection du milieu de dilution (à droite). L'échelle micrométrique représente 200  $\mu$ m (figures du haut) ou 100  $\mu$ m (figures du bas).

### **b. L'évaluation longitudinale (J3, J7, J14, J28)**

#### **♦ Le marquage longitudinal au rouge congo**

Le marquage histologique au rouge congo révèle une agrégation de peptides A $\beta$  (1-40) à tous les temps étudiés (3, 7, 14 et 28 jours post-injection) (**Fig. 56**).



**Figure 56.** Marquage au rouge congo au niveau du gyrus denté des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) à 3, 7, 14 et 28 jours post-injection. Les flèches indiquent le site d'agrégation peptidique.

#### **♦ L'autoradiographie *in vitro* au [ $^{18}$ F]MPPF**

La fixation du [ $^{18}$ F]MPPF dans l'hippocampe dorsal n'est significativement modifiée que 7 jours après l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) en comparaison du groupe de rats injectés avec le milieu de dilution. Dans l'hippocampe dorsal, à 3, 14 et 28 jours après l'injection des peptides A $\beta$  (1-40), les valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}$ F]MPPF sont respectivement de  $456 \pm 48$  psl.mm $^{-2}$  (n = 4),  $534 \pm 54$  psl.mm $^{-2}$  (n = 4),  $411 \pm 41$  psl.mm $^{-2}$  (n = 4), en comparaison du groupe de rats injecté avec le milieu de dilution ( $478 \pm 56$  psl.mm $^{-2}$ ,  $513 \pm 46$  psl.mm $^{-2}$ ,  $414 \pm 48$  psl.mm $^{-2}$ ; n = 4), (**Fig. 58**).

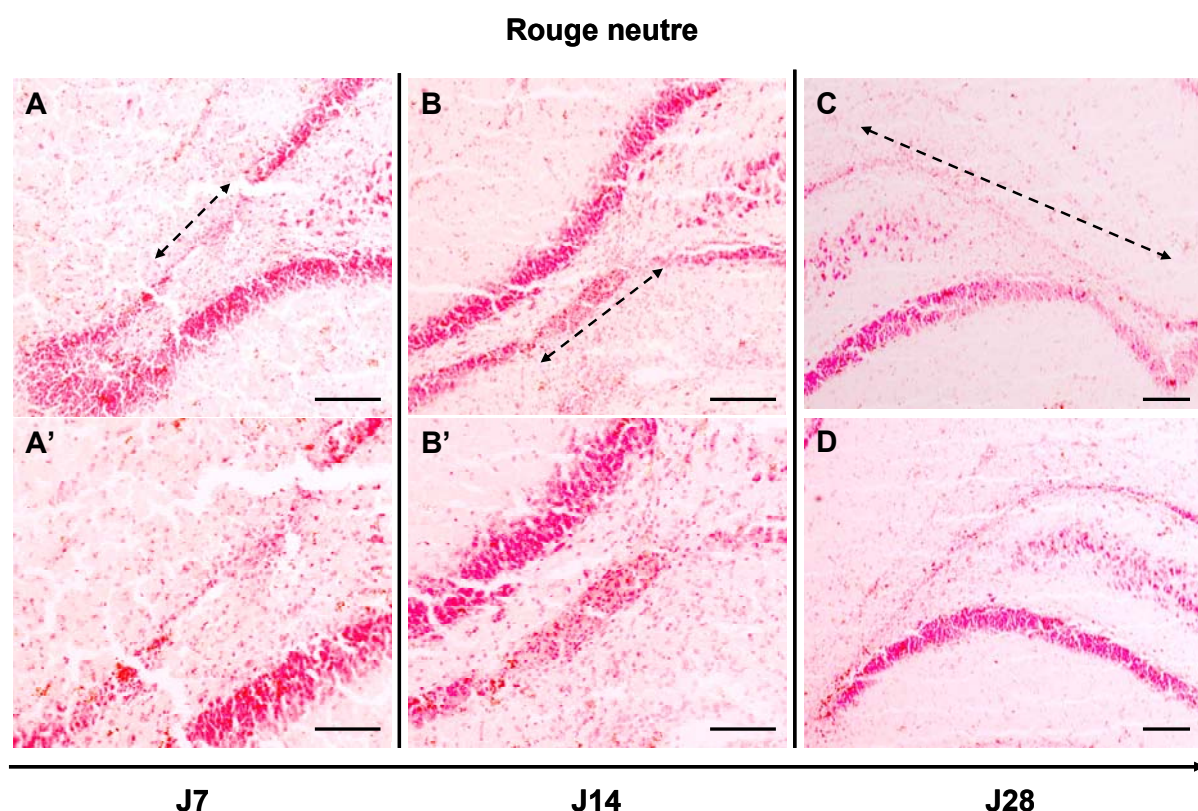
#### **♦ Le dosage de la sérotonine tissulaire**

Les dosages longitudinaux dans l'hippocampe dorsal révèlent une augmentation significative (+52,3%; p<0,05) de la concentration tissulaire en sérotonine, 14 après l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) ( $294 \pm 24$  pmol.g $^{-1}$  de tissu; n = 4) en comparaison des rats injectés avec le milieu de dilution seulement ( $193 \pm 12$  pmol.g $^{-1}$  de tissu; n = 4). Les valeurs mesurées à 3, 7 et 28 jours sont respectivement de  $207 \pm 56$  pmol.g $^{-1}$  de tissu,  $375 \pm 60$  pmol.g $^{-1}$  de tissu,  $427 \pm 60$  pmol.g $^{-1}$  de tissu chez les rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) et de  $199 \pm 22$  pmol.g $^{-1}$  de tissu,  $354 \pm 45$  pmol.g $^{-1}$  de tissu,  $348 \pm 145$  pmol.g $^{-1}$  de tissu chez les rats injectés avec le milieu de dilution (**Fig. 58**).



### ♦ Le marquage longitudinal au rouge neutre

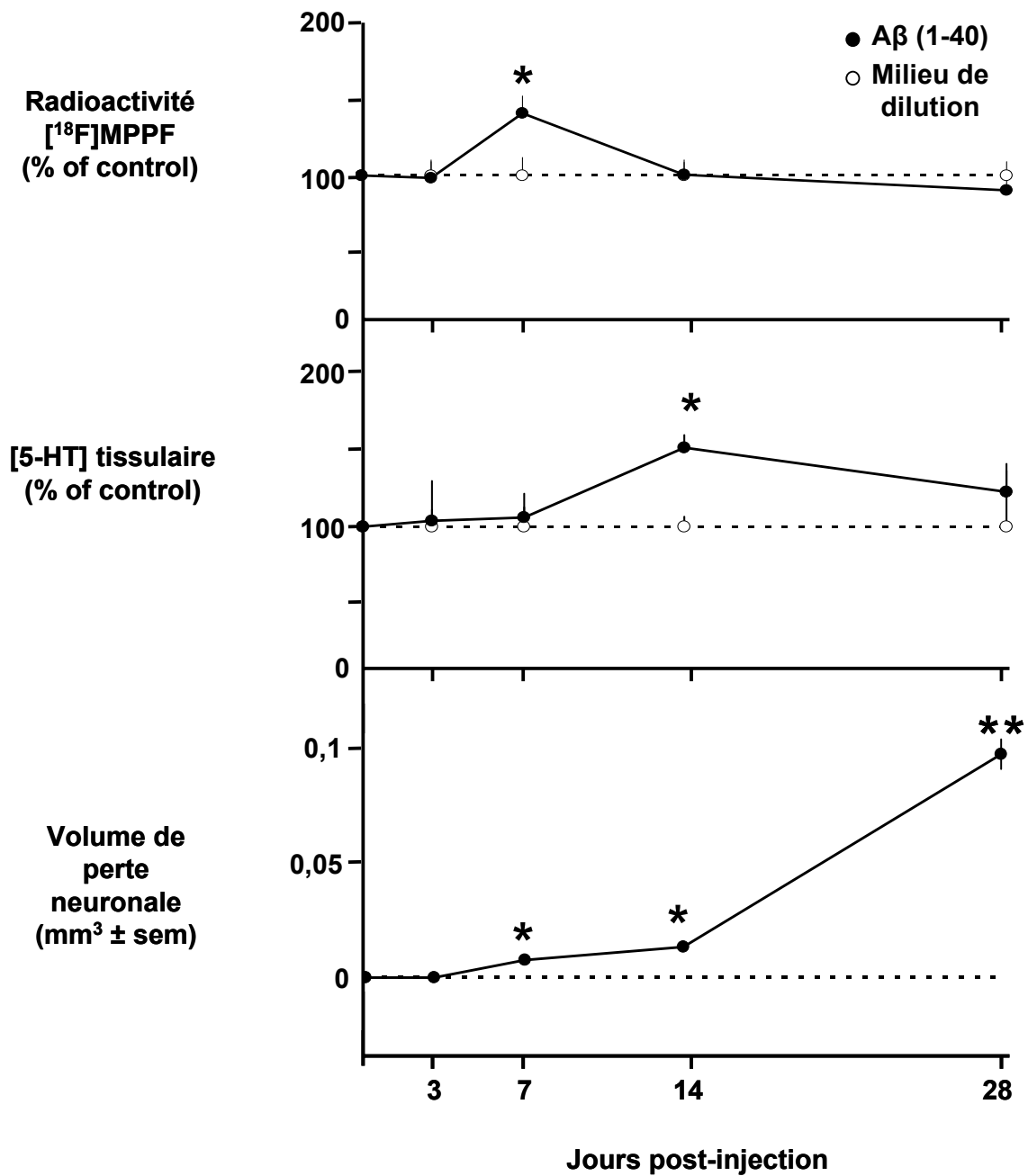
L'étendue de la perte neuronale, visible au niveau de la couche granulaire du gyrus denté des rats ayant été injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40), a été évaluée en trois dimensions. La dimension "antéro-postérieure" correspond au nombre de coupes (30  $\mu$ m d'épaisseur) où l'on retrouve une perte neuronale. Les dimensions "médio-latérale" et "dorso-ventrale" sont dans le plan de la coupe et sont évaluées par comparaison à l'échelle micrométrique. L'évaluation du volume de perte neuronale dans le gyrus denté montre une augmentation progressive au cours du temps, à partir de 7 jours post-injection. La perte neuronale dans le gyrus denté n'est pas discernable à 3 jours post-injection. A 7, 14 et 28 jours post-injection des peptides A $\beta$  (1-40), les volumes de perte neuronale dans le gyrus denté sont respectivement de  $0,008 \pm 0,001$  mm<sup>3</sup>,  $0,014 \pm 0,002$  mm<sup>3</sup> (+75%; n = 4) et  $0,103 \pm 0,007$  mm<sup>3</sup> (+635%; n = 4) (**Fig. 57** pour les images et **Fig. 58** pour les valeurs).



**Figure 57.** Marquage au rouge neutre, au niveau du gyrus denté des rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-40) à 7 jours (A, A'), 14 jours (B, B') et 28 jours (C, C') post-injection. Les échelles micrométriques représentent 200  $\mu$ m (A, B, C, C') ou 100  $\mu$ m (A', B'). Les zooms optiques utilisés sont de x5 (C, C'), x10 (A, B) et x20 (A', B'). Les flèches en pointillés indiquent l'étendue médio-latérale de la perte neuronale.



♦ Résumé des effets longitudinaux

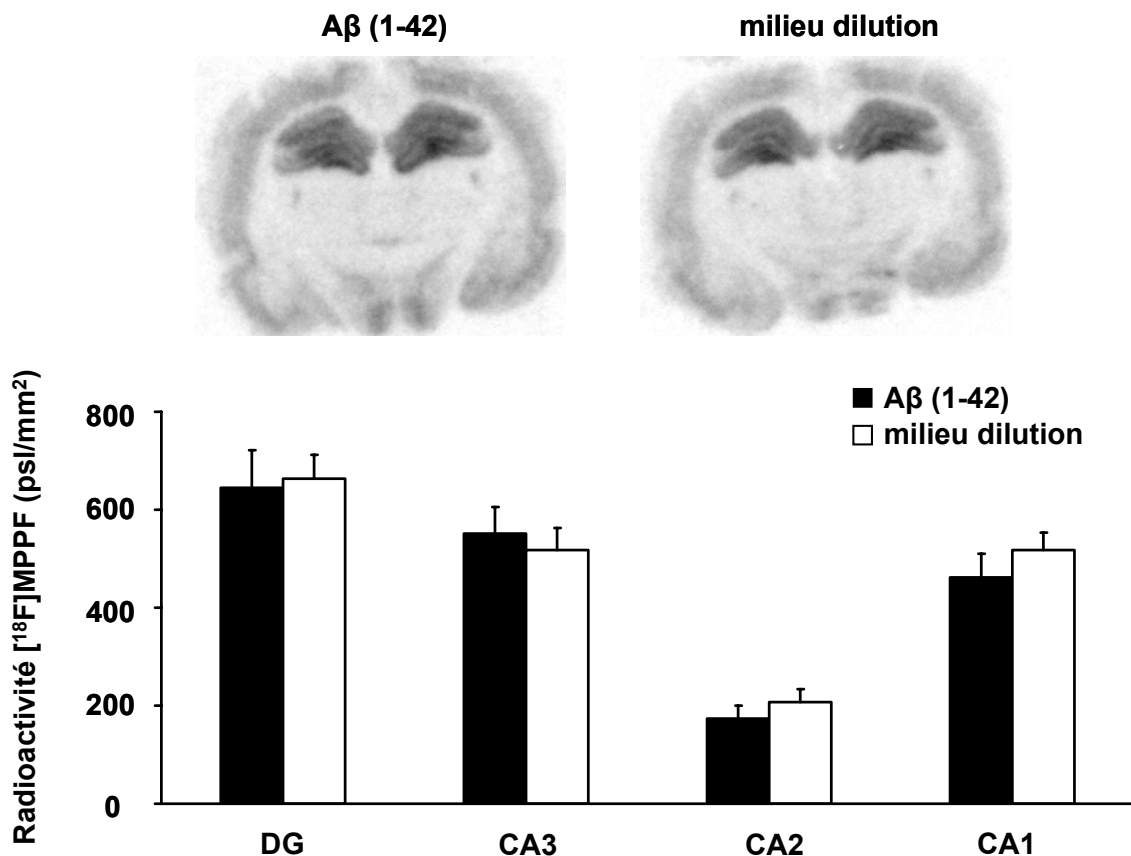


**Figure 58.** Effets longitudinaux des peptides Aβ (1-40) sur la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF in vitro (en haut), sur la concentration en sérotonine tissulaire (au milieu) et sur le volume de perte neuronale dans la couche granulaire du DG, au niveau de l'hippocampe dorsal (en comparaison du groupe de rat injectés avec le milieu de dilution des peptides seulement = "pointillés").

## 2. Les autres modèles d'injection intracérébrale de peptides amyloïdes

### a. L'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$ (1-42)

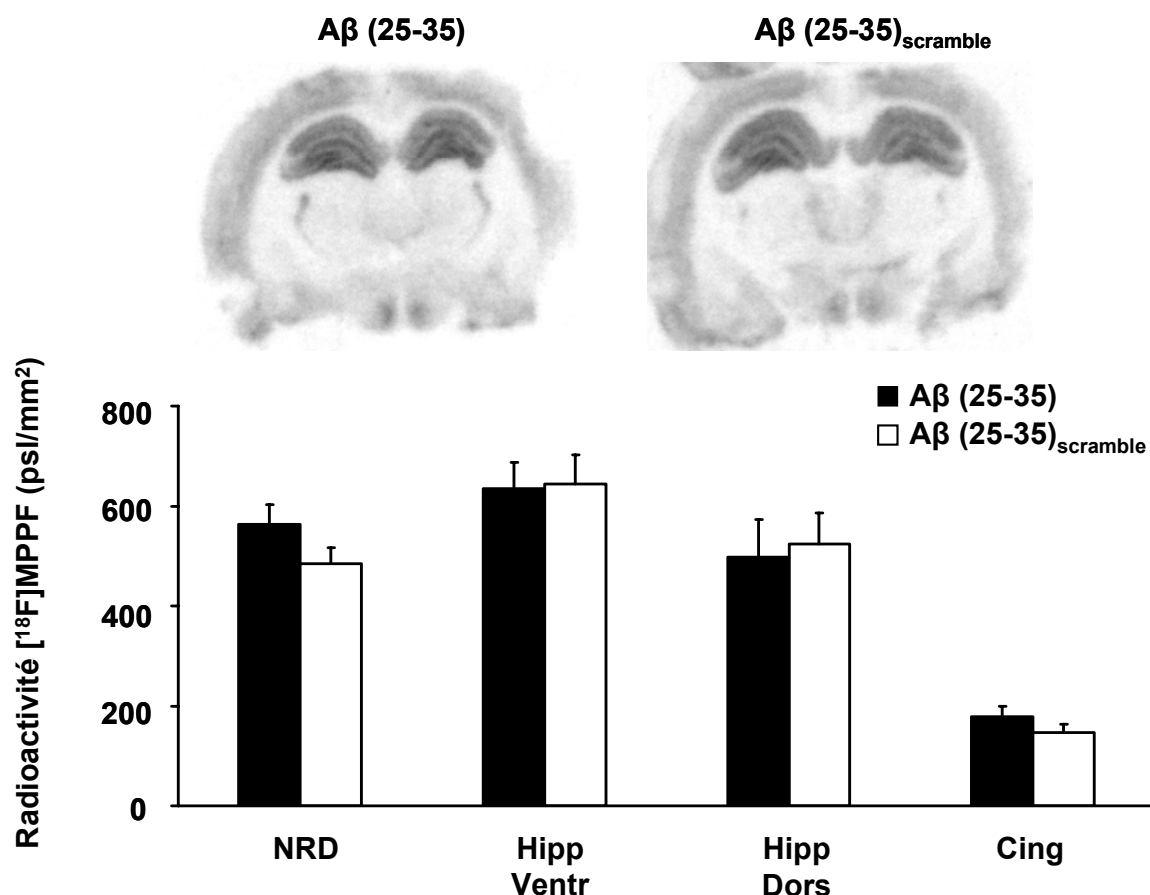
Des rats ont été injectés avec des peptides A $\beta$  (1-42) en suivant la même procédure que pour le modèle A $\beta$  (1-40). La fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF *in vitro* ne montre pas de différence significative au niveau de l'hippocampe dorsal 7 jours après l'injection des peptides A $\beta$  (1-42) ( $501 \pm 51$  psl.mm $^{-2}$ ; n = 4) en comparaison des rats injectés avec le milieu de dilution seulement ( $534 \pm 41$  psl.mm $^{-2}$ ; n = 4). D'autre part, l'analyse des sous-régions de l'hippocampe dorsal confirme l'absence de modification de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF (**Fig. 59**).



**Figure 59.** Images autoradiographiques *in vitro* de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau de l'hippocampe dorsal de rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-42) sept jours auparavant (en haut). Histogrammes représentant les valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau des sous-régions de l'hippocampe dorsal de rats injectés avec les peptides A $\beta$  (1-42) en comparaison de rats injectés avec le milieu de dilution.

**b. L'injection intracérébroventriculaire de peptides A $\beta$  (25-35)**

La fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF dans l'hippocampe dorsal, 28 jours après l'injection i.c.v. de peptides A $\beta$  (25-35) n'est pas modifiée en comparaison de rats injectés avec les peptides A $\beta$  (25-35)<sub>scramble</sub> ( $497 \pm 75 \text{ psl.mm}^{-2}$  (n = 5) versus  $523 \pm 63 \text{ psl.mm}^{-2}$  (n = 5)) (**Fig. 60**).



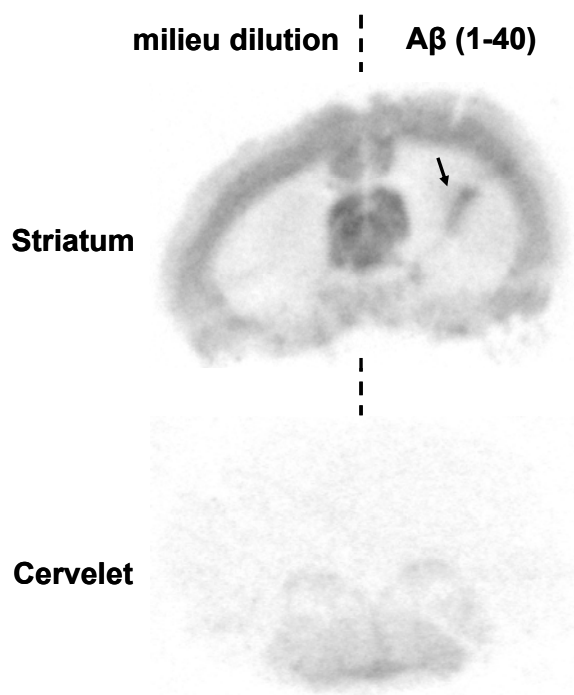
**Figure 60.** Images autoradiographiques *in vitro* de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau de l'hippocampe dorsal de rats injectés (i.c.v.) avec des peptides A $\beta$  (25-35) ou avec la forme A $\beta$  (25-35)<sub>scramble</sub> (en haut). Histogrammes représentant les valeurs de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau de différentes régions cérébrales de rat injectés (i.c.v.) avec les peptides A $\beta$  (25-35) ou leur forme "scramble" (en bas). NRD: noyau du raphé dorsal; Hipp Ventr: hippocampe ventral; Hipp Dors: hippocampe dorsal; Cing: cortex cingulaire.

**c. L'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) dans le striatum**

L'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) dans le striatum de rats ( $n = 2$ ), région présentant une très faible densité de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, induit l'apparition d'un marquage [ $^{18}$ F]MPPF à 7 jours post-injection. Aucun changement n'est observé du côté controlatéral (**Fig. 61**).

**d. L'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) dans le cervelet**

L'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) dans le cervelet de rat (injection controlatérale de milieu de dilution), n'induit pas de variation de la fixation du [ $^{18}$ F]MPPF à 7 jours post-injection. ( $n = 2$ ) (**Fig. 61**).

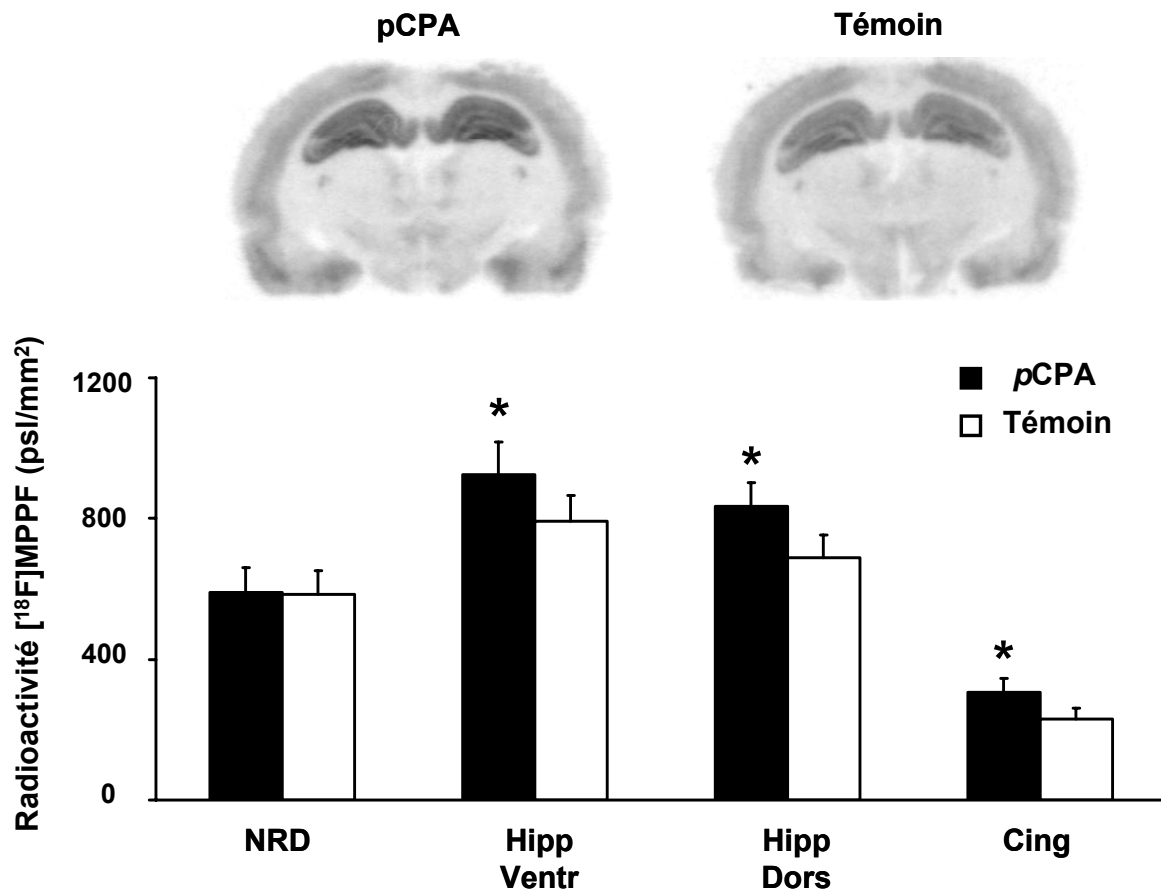


**Figure 61.** Images par autoradiographies *in vitro* de la fixation du [ $^{18}$ F]MPPF, 7 jours après l'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) au niveau du striatum (en haut) ou du cervelet (en bas). La flèche indique la présence d'un marquage au [ $^{18}$ F]MPPF au niveau du site d'injection des peptides, dans le striatum.

### 3. Le modèle de déplétion sérotoninergique

#### a. L'autoradiographie *in vitro* au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF

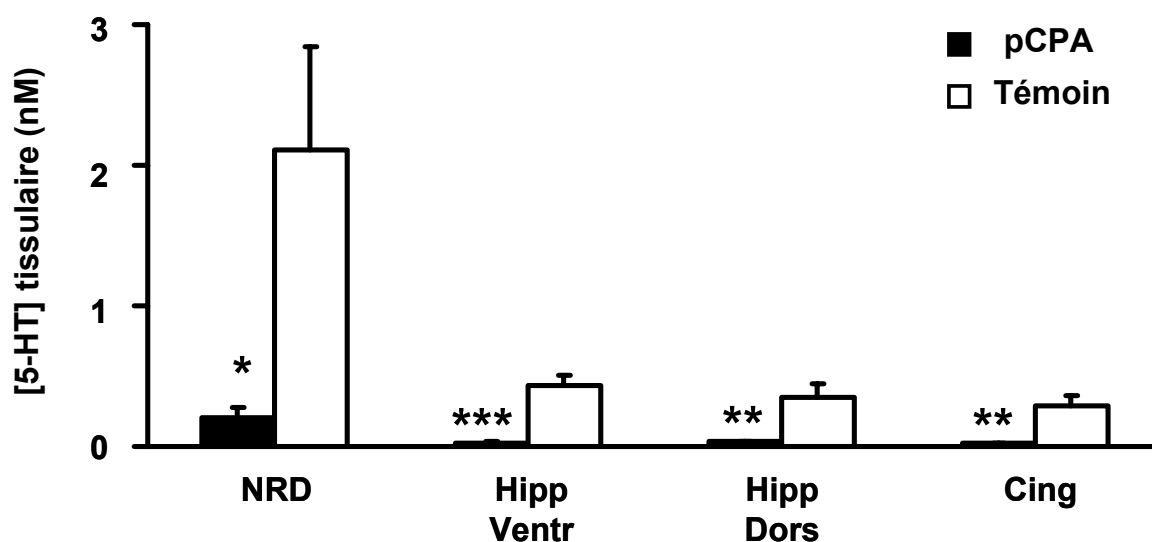
Les valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF chez les rats traités pendant une semaine à la pCPA ( $300 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$ ) sont de  $589 \pm 70 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le noyau du raphé dorsal ( $n = 5$ ), de  $925 \pm 91 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'hippocampe ventral ( $+16,9\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ), de  $834 \pm 68 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'hippocampe dorsal ( $+21,4\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) et de  $304 \pm 40 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le cortex cingulaire ( $+32,2\%$ ;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ). Les valeurs chez les rats témoins sont respectivement de  $584 \pm 66 \text{ psl.mm}^{-2}$  (NRD;  $n = 5$ ),  $791 \pm 73 \text{ psl.mm}^{-2}$  (Hipp Ventr;  $n = 5$ ),  $687 \pm 66 \text{ psl.mm}^{-2}$  (Hipp Dors;  $n = 5$ ) et  $230 \pm 31 \text{ psl.mm}^{-2}$  (Cing;  $n = 5$ ) (**Fig. 62**).



**Figure 62.** Images autoradiographiques de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF *in vitro* dans l'hippocampe dorsal de rats traités à la pCPA ( $300 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ i.p.}$ ; 5 jours) en comparaison de rats témoins (en haut). Histogrammes correspondant aux valeurs semi-quantitatives de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF dans les différentes régions cérébrales (NRD: noyau du raphé dorsal; Hipp Ventr: hippocampe ventral; Hipp Dors: hippocampe dorsal; Cing: cortex cingulaire) de rats traités par rapports aux rats témoins (\* correspond à  $p < 0,05$  au test *t* de Student).

### **b. Le dosage tissulaire de la sérotonine**

Le traitement de 5 jours à la 4-chloro-DL-phénylalanine éthyler hydrochloride (ou pCPA) (300 mg.kg<sup>-1</sup> i.p.) provoque une diminution de la concentration en sérotonine tissulaire dans toutes les structures étudiées. Chez les rats témoins, la concentration en sérotonine tissulaire est de  $2 \pm 0,7$  nmol.g<sup>-1</sup> de noyau du raphé dorsal (NRD) (n = 5),  $428 \pm 72$  pmol.g<sup>-1</sup> d'hippocampe ventral (Hipp Ventr) (n = 5),  $344 \pm 10$  pmol.g<sup>-1</sup> d'hippocampe dorsal (Hipp Dors) (n = 5) et  $289 \pm 77$  pmol.g<sup>-1</sup> de cortex cingulaire (Cing) (n = 5). Chez les rats traités, la concentration en sérotonine tissulaire est respectivement de  $202 \pm 77$  pmol.g<sup>-1</sup> de NRD (-90%; p<0,05; n = 5),  $28 \pm 6$  pmol.g<sup>-1</sup> d'Hipp Ventr (-93%; p<0,001; n = 5),  $32 \pm 5$  pmol.g<sup>-1</sup> d'Hipp Dors (-90%; p<0,01; n = 5) et de  $21 \pm 4$  pmol.g<sup>-1</sup> de Cing (-92%; p<0,01; n = 5) (**Fig. 63**).

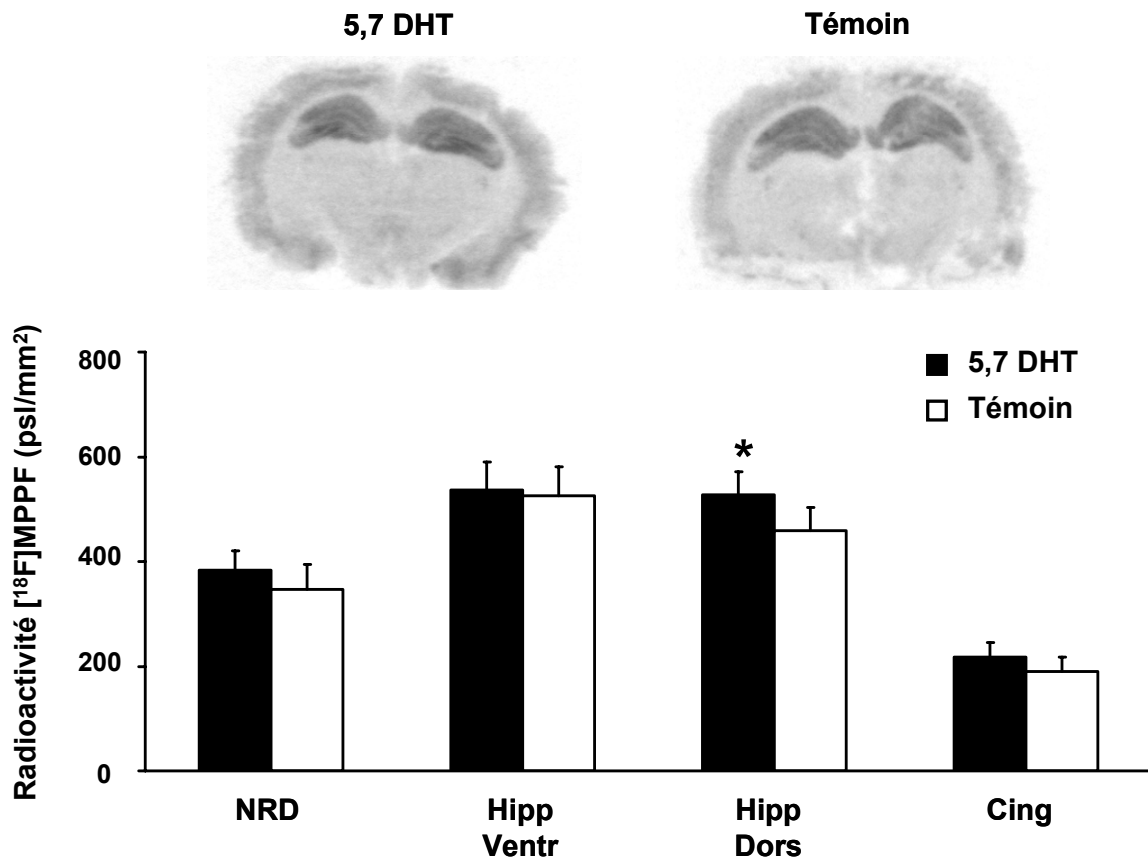


**Figure 63.** Histogrammes représentant les concentrations en sérotonine tissulaires dans le noyau du raphé dorsal (NRD), l'hippocampe ventral (Hipp Ventr), l'hippocampe dorsal (Hipp Dors) et le cortex cingulaire (Cing) de rats traités à la pCPA (300 mg.kg<sup>-1</sup> i.p.; 5 jours) en comparaison de rats témoins (\* correspond à p<0,05, \*\* à p<0,01, \*\*\* à p<0,001, au test t de Student).

## 4. Le modèle de dénervation sérotoninergique

### a. L'autoradiographie in vitro au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF

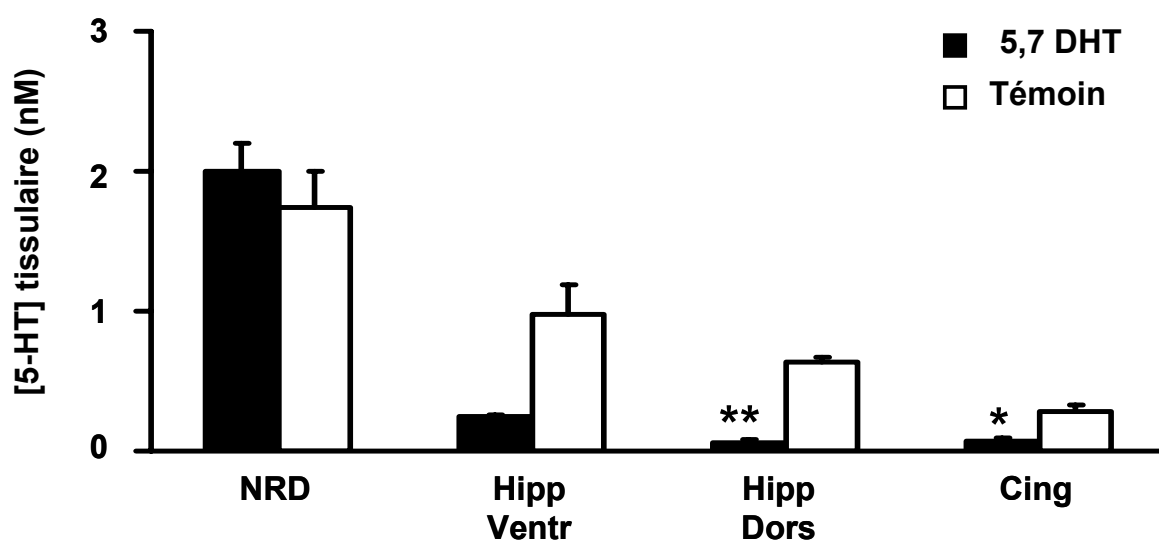
Les valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF chez les rats injectés avec la 5,7 DHT sont de  $383 \pm 37 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le NRD ( $n = 5$ ), de  $535 \pm 54 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'Hipp Ventr ( $n = 5$ ), de  $527 \pm 43 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'Hipp Dors (+14,8%;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) et de  $217 \pm 26 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le Cing ( $n = 5$ ) par rapport aux valeurs chez les rats témoins de  $346 \pm 47 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le NRD ( $n = 5$ ),  $525 \pm 54 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'Hipp Ventr ( $n = 5$ ),  $459 \pm 44 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans l'Hipp Dors ( $n = 5$ ) et  $190 \pm 27 \text{ psl.mm}^{-2}$  dans le Cing ( $n = 5$ ) (**Fig 64**).



**Figure 64.** Images autoradiographiques de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF in vitro dans l'hippocampe dorsal de rats injectés avec la 5,7 DHT dans le cingulum bundle (CB) et le fimbria fornix (FF) en comparaison de rats témoins (en haut). Histogrammes correspondant aux valeurs semi-quantitatives de fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF dans les différentes régions cérébrales (NRD: noyau du raphé dorsal; Hipp Ventr: hippocampe ventral; Hipp Dors: hippocampe dorsal; Cing: cortex cingulaire) de rats injectés par rapports aux rats témoins (\* correspond à  $p < 0,05$  au test t de Student).

### **b. Le dosage tissulaire de la sérotonine**

Quatorze jours après injection de la 5,7 dihydroxytryptamine (5,7 DHT) dans le cingulum bundle (CB) et le fimbria fornix (FF) de rats, la concentration en sérotonine tissulaire est de  $2 \pm 0,1 \text{ nmol.g}^{-1}$  de noyau du raphé dorsal (NRD) ( $n = 4$ ),  $245 \pm 10 \text{ pmol.g}^{-1}$  d'hippocampe ventral (Hipp Ventr) ( $n = 4$ ),  $59 \pm 18 \text{ pmol.g}^{-1}$  d'hippocampe dorsal (Hipp Dors) (-90%;  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) et  $66 \pm 27 \text{ pmol.g}^{-1}$  de cortex cingulaire (Cing) (-77%;  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Chez les rats témoins, la concentration en sérotonine tissulaire est respectivement de  $1,7 \pm 0,2 \text{ pmol.g}^{-1}$  de NRD ( $n = 4$ ),  $980 \pm 211 \text{ pmol.g}^{-1}$  d'Hipp Ventr ( $n = 4$ ),  $634 \pm 32 \text{ pmol.g}^{-1}$  d'Hipp Dors ( $n = 5$ ) et de  $286 \pm 40 \text{ pmol.g}^{-1}$  de Cing ( $n = 4$ ) (**Fig. 65**).



**Figure 65.** Histogrammes représentant les concentrations en sérotonine tissulaire dans le noyau du raphé dorsal, l'hippocampe ventral, l'hippocampe dorsal et le cortex cingulaire de rats injectés avec la 5,7 DHT dans le cingulum bundle et le fimbria fornix par rapport aux rats témoins (\* correspond à  $p < 0,05$ , \*\* à  $p < 0,01$ , au test  $t$  de Student).



## E. Discussion

L'objectif principal de cette partie de mes travaux de thèse est d'explorer la neurotransmission sérotoninergique par imagerie TEP préclinique au [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, dans un modèle d'injection de peptides amyloïdes chez le rat, afin d'évaluer sa capacité à reproduire une augmentation transitoire de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. Un objectif complémentaire réside dans l'évaluation des conséquences de l'injection de ces peptides sur la neuroanatomie au cours du temps, afin d'apporter des éléments de réponses aux mécanismes compensatoires pouvant être stimulés.

### 1. Le choix du modèle d'injection intrahippocampique de peptides amyloïdes chez le rat

Plusieurs raisons nous ont décidé à travailler sur un modèle de rat avec injection de peptides amyloïdes plutôt que sur un modèle de souris transgénique. (i) La taille plus importante du cerveau de rat, compatible avec l'imagerie, (ii) les difficultés d'accès à des souris transgéniques et, (iii) le temps nécessaire à la mise en place des lignées, ont été des paramètres importants dans notre choix de modèle. Il est certain que les modèles avec administration exogène de peptides amyloïdes dans des cerveaux de rats sains, sont loin de reproduire toute la complexité de la MA chez l'homme. Néanmoins, de nombreuses études utilisant ces modèles ont rapporté une neurodégénérescence et une activation microgliale à proximité du site de dépôt des peptides (constituant une caractéristique importante de la MA chez l'homme) et que les modèles de souris transgéniques ont du mal à reproduire (voir [Stéphan et Phillips 2005](#), pour revue). Cette constatation suggère qu'il existe chez l'homme des facteurs participant à une facilitation de la mort neuronale, ou que chez les modèles de souris transgéniques, l'introduction de gène humain mutant (APP ou PS1) déclenche l'apparition de facteurs compensatoires luttant contre la mort neuronale (voir [Stéphan et Phillips 2005](#), pour revue). Enfin, l'intérêt de travailler sur l'injection exogène de peptides amyloïdes dans le cerveau de rat réside dans la rapidité d'obtention d'effets spécifiques. Au contraire, chez les souris transgéniques, il est nécessaire d'attendre plusieurs mois avant que les souris âgées expriment les caractéristiques pathophysiologiques de la MA.

Plusieurs équipes ont étudié les effets de l'injection intracérébrale ou intra-cérébro-ventriculaire de peptides amyloïdes chez des rongeurs sains, en se basant sur l'hypothèse de la "cascade amyloïde" (Hardy et Allsop, 1991; Tanzi et Bertram, 2005 pour revue). Une multitude d'études a conduit à des résultats variés. Ceci n'est pas surprenant, au vu des différences de longueur du peptide amyloïde, de mode d'administration, de milieu de dilution, de délai entre l'injection et les analyses, et de l'état d'agrégation des peptides au moment de l'injection. La forme la plus soluble du peptide amyloïde (A $\beta$  (1-40)), en comparaison des formes longues plus propices à former des fibrilles (A $\beta$  (1-42) et (1-43)), s'est révélée être évacuée assez rapidement du cerveau par phagocytose, par activité protéasique (Frautschy et al., 1992) ou par d'autres systèmes de transport actif (voir Guenette 2003, pour revue). Cependant, dans le cerveau de rat, il a été montré que les peptides A $\beta$  (1-40) injectés sous une forme soluble peuvent constituer des agrégats (rouge congo) alors que les A $\beta$  (1-42) ne le peuvent pas. Ce résultat a conduit Shin et al. (1997) à émettre l'hypothèse que des facteurs inhibant la constitution de fibrilles A $\beta$  (1-42) à partir de la forme soluble, devaient exister dans le cerveau des rats. De nombreuses études ont montré que les peptides A $\beta$  (1-40) peuvent être perfusés intracérébralement et y rester pendant plusieurs semaines s'ils sont injectés sous une forme préagrégée (Giovannelli et al, 1995; Gonzalo-Ruiz et Sanz, 2002; Gonzalo-Ruiz et al, 2003; Rosales-Corral et al, 2004; Stéphan et al, 2001, 2003, 2005; Wu et al, 2007).

Un modèle récent d'injection de peptides A $\beta$  (1-40) préagrégés a attiré notre attention pour sa capacité à induire, en seulement une semaine, une mort neuronale dans la couche CA1 de l'hippocampe dorsal de rat (Wu et al., 2007). Nous avons choisi d'injecter des peptides A $\beta$  (1-40) préagrégés pour garantir leur présence au cours du temps. Nos résultats ont confirmé qu'ils étaient présents de 3 à 28 jours après leur injection. Nous avons pensé que cette neurotoxicité hippocampique rapide, induite par l'injection des peptides amyloïdes chez le rat, pourrait constituer un modèle d'étude adapté et intéressant pour l'imagerie isotopique. D'autre part, le site d'injection des peptides, dans le gyrus denté de l'hippocampe dorsal, est l'une des premières régions où des plaques amyloïdes ont été décrites chez l'homme atteint de MA (Duyckaerts et al., 1997).

## **2. La microTEP ne détecte aucune modification de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> *in vivo***

Nos résultats *in vivo* en microTEP ont montré que, 7 jours après l'injection des peptides A $\beta$  (1-40), la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF dans l'hippocampe dorsal de rat n'était pas modifiée. Nous avons constaté la présence de peptides agrégés (marquage au rouge congo) ainsi qu'une mort neuronale (marquage VGLUT1), au niveau du gyrus denté de l'hippocampe dorsal. Par analogie aux études menées avec la caméra clinique chez l'homme, nous nous attendions à observer, soit une augmentation de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF (Truchot et al., 2007) dans le cas de la mise en place de mécanismes compensatoires suite à l'agression par des peptides A $\beta$  (1-40), soit une diminution de cette fixation (Truchot et al., 2007; Kepe et al., 2006; Lanctôt et al., 2007) imputable à la perte neuronale.

Nous expliquons l'absence de modification de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF par la faible résolution spatiale de la microPET (1,5 à 2 mm), insuffisante pour appréhender les sous-régions (gyrus denté) de l'hippocampe dorsal affectées par l'injection focalisée des peptides A $\beta$  (1-40). Nos résultats histologiques vont en faveur de cette hypothèse lorsqu'ils montrent que 7 jours après l'injection, la neurotoxicité des peptides A $\beta$  (1-40) se limite à la proximité du site d'injection, dans une petite partie du gyrus denté mesurant approximativement 300  $\mu$ m de diamètre. Ainsi, l'usage de la microTEP nous paraît limité dans l'exploration de ce modèle.

## **3. La fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF *in vitro* est augmentée 7 jours après l'injection des peptides A $\beta$ (1-40)**

L'autoradiographie *in vitro* possède une résolution spatiale de l'ordre de 50  $\mu$ m (Barthe et al., 2007) adaptée à l'analyse précise des conséquences de l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) préagrégés. Sept jours après cette injection, nous avons montré que la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF est augmentée de 22,3% dans l'hippocampe dorsal par rapport au groupe de rats injectés avec le milieu de dilution seulement. L'analyse des sous-régions de l'hippocampe dorsal (CA1, CA2, CA3 et DG), a permis d'accéder aux variations précises de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF. De manière intéressante, il est apparu que le gyrus denté, lieu de l'injection des peptides, est le site démontrant la plus forte augmentation (+41,5%;  $p < 0,05$ ) de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF en comparaison des valeurs semi-quantitatives retrouvées dans le groupe de rat injectés avec le milieu de dilution des peptides. Ainsi, des processus se mettant en place autour du site

d'injection semblent majoritairement contribuer à la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au niveau de l'hippocampe dorsal. Le modèle rat reproduit une surexpression transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, démontrant que les peptides amyloïdes peuvent avoir un effet sur l'expression de ce type de récepteurs au niveau hippocampique.

#### **4. L'augmentation de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF *in vitro*: conséquence d'une diminution de la sérotonine endogène ?**

Selon la théorie classique de la compétition (Seeman et al., 1989), une diminution de la concentration en sérotonine endogène, au niveau de la fente synaptique, rend accessible des sites de fixation pour le [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF (Zimmer et al., 2003). Cependant, plusieurs faits vont à l'encontre de cette théorie.

(i) Les expériences d'autoradiographies sont menées *in vitro*, c'est-à-dire dans des conditions où l'effet de la sérotonine endogène est limité ou presque nul.

(ii) D'autre part, nous avons montré que le traitement à la pCPA de rats diminue la concentration en sérotonine tissulaire dans toutes les régions cérébrales étudiées, du noyau sérotoninergique (NRD) à ses projections (cortex cingulaire et hippocampes). Si la théorie de la compétition s'appliquait, nous devrions observer une augmentation de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF *in vitro*, dans toutes les régions étudiées. Cependant, malgré la baisse de la concentration tissulaire en sérotonine dans le NRD, la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF reste inchangée.

(iii) Enfin, les expériences de dosage de la sérotonine tissulaire dans l'hippocampe dorsal de rats injectés avec les peptides amyloïdes A $\beta$  (1-40) une semaine auparavant, ont démontré que la concentration en sérotonine n'est pas diminuée. Elle aurait même tendance à être augmentée.

#### **5. Les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> surexprimés ne sont pas couplés aux protéines G**

Le [ $^{18}\text{F}$ ]F15599 est une molécule agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> développée par les laboratoires Pierre Fabre (Maurel et al., 2007), radiomarké au fluor 18 avec succès dans notre laboratoire et ayant démontré d'excellentes capacités de liaison aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, couplés aux protéines G, *in vitro* (Lemoine et al., 2008). Il est important de noter que des expériences sur membranes reconstituées ont permis de montrer que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>

existent sous une forme à haute affinité (couplés aux protéines G) et une forme à basse affinité (non couplés aux protéines G) (Clawges et al., 1997). Les antagonistes, comme le [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, se fixent sur ces deux populations avec la même affinité, sans pouvoir les distinguer (Gozlan et al., 1995; Aznavour et Zimmer, 2007 pour revue). Au contraire, les agonistes, comme le [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, se lient préférentiellement aux récepteurs à haute affinité couplés aux protéines G, permettant par conséquent une mesure des récepteurs fonctionnels (Watson et al., 2000). Les autoradiographies *in vitro* réalisées au [ $^{18}\text{F}$ ]F15599 dans l'hippocampe dorsal (et le gyrus denté), n'ont pas montré de modifications du niveau de fixation entre des rats injectés avec les peptides et des rats injectés avec le milieu de dilution. Le niveau de couplage des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aux protéines G ne semble donc pas être affecté par l'injection des peptides. Seul le [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF a été en mesure de détecter une augmentation du niveau de liaison dans le gyrus denté. Ces résultats vont dans le sens d'une augmentation de l'expression de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> non-couplés aux protéines G, 7 jours après l'injection de peptides A $\beta$  (1-40).

Certaines approches thérapeutiques tentent d'intervenir pharmacologiquement sur les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA. En effet, des études ont montré que des antagonistes de ces récepteurs présentent des propriétés procognitives (Bowen et al., 1994; Kowall et Beal, 1991). La logique de cette approche s'appuie sur la capacité des antagonistes 5-HT<sub>1A</sub> à faciliter la neurotransmission glutamatergique (Bliss et Collingridge, 1993; Bowen et al., 1994) et la neurotransmission cholinergique (Madjid et al., 2006). Il est bien décrit que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> hyperpolarisent la membrane des neurones qui les portent, notamment les neurones pyramidaux et granulaires de l'hippocampe. Ainsi, le blocage de ce type de récepteurs augmente l'activité de ces neurones (voir Lanfumey et Hamon, 2000 pour revue). L'équipe de Schechter et al. (2005) a développé un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ayant pour but d'augmenter les capacités cognitives. Des résultats lors d'essais cliniques n'ont pas encore été rapportés. Une autre approche thérapeutique a été proposée par l'équipe de Sato et al., (2007), selon l'hypothèse que des agonistes des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourraient conduire à des effets bénéfiques dans le traitement des symptômes non-cognitifs associés à la MA et observés chez 20 à 80% des patients avec démence (Lawlor, 2004). Là encore, des résultats convergents sont attendus pour poursuivre la piste thérapeutique. Nos résultats, suggérant une surexpression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, dans un état non-fonctionnel (non couplés aux protéines G), pourraient être défavorables à l'usage de molécules à visée 5-HT<sub>1A</sub> (sous réserve de transposition direct d'un modèle animal à l'homme).

Cependant, il est à noter que l'équipe de Weinstein et al. (1996) a montré, par autoradiographie au [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT (agoniste à haute affinité pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>), que le GppNHp (analogue non-hydrolysable du GTP) avait un potentiel d'inhibition de la fixation du [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT diminué chez des patients atteints de la MA, révélant une perte de couplage aux protéines G. Dans ce cas, le nombre de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (évalué par le Bmax) n'était pas modifié malgré une perte cellulaire, bien décrite dans la MA.

## **6. Quelle sous population cellulaire surexprime ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ?**

Jusque-là, nous avons montré que l'injection de peptides Aβ (1-40) préagrégés dans le gyrus denté de rat provoquait, en une semaine, la surexpression de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, préférentiellement non couplés à leur protéine G, c'est-à-dire dans un état transitoire d'inactivité. Cependant, l'imagerie isotopique ne nous donne pas assez d'informations pour que l'on puisse déterminer le type cellulaire (neurones, cellules gliales) portant ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

Afin d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes mis en jeu, nous avons étudié les conséquences neuroanatomiques au niveau de l'hippocampe dorsal. Le marquage histologique au rouge neutre, permettant de visualiser le cytoplasme de toutes les cellules neurales (neurones et cellules gliales), a révélé une diminution de l'épaisseur de la couche des neurones granulaires du gyrus denté à proximité du site d'injection (marquage rouge congo). Le marquage des transporteurs glutamatergiques de type 1 (VGLUT1) a démontré que les peptides agrégés avaient provoqué une perte évidente de neurones glutamatergiques de la couche granulaire du gyrus denté. Il est important de rappeler que les neurones granulaires du gyrus denté sont majoritairement glutamatergiques, dans l'hippocampe de rats adultes (Gomez-Lira et al., 2005). D'autre part, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont exprimés en forte densité sur les somas et dendrites de ces neurones granulaires (Kia et al., 1996a, 1996b; Lanfumey and Hamon, 2000; Pompeiano et al., 1992; Riad et al., 2000). Le marquage immunohistochimique adjacent de la GFAP a révélé une réaction astrocytaire intense, au niveau du site d'injection des peptides Aβ (1-40) et autour de ce site, comme si les cellules astrocytaires venaient compenser la perte de neurones granulaires.

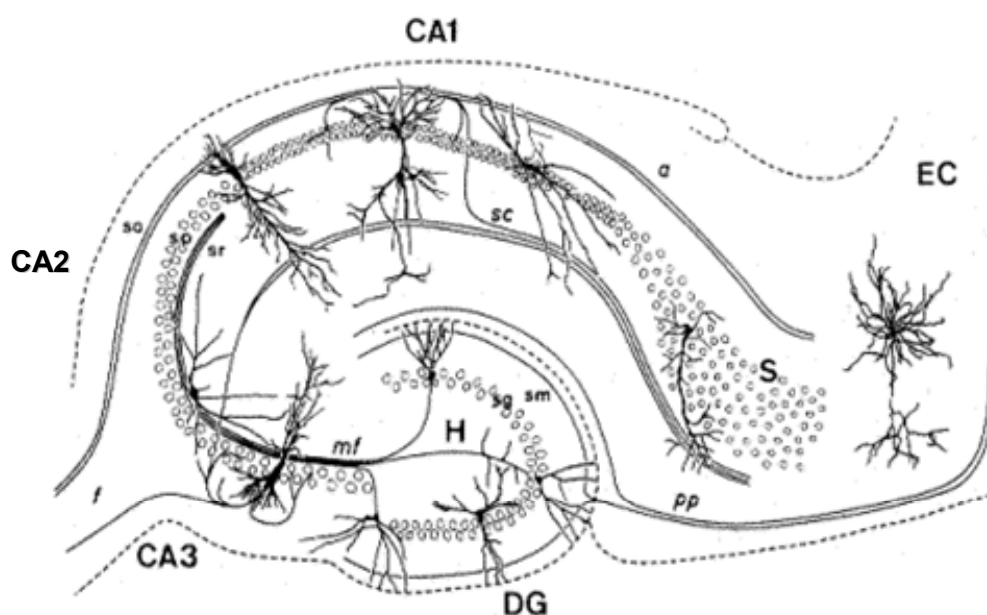
### **a. Un "sprouting" des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ?**

Il est possible que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aient été surexprimés par des neurones ayant "échappé" à la neurotoxicité des peptides Aβ (1-40) agrégés. Le "sprouting" a été décrit par Azmitia et al. (1978) dans des modèles de dénervation sérotoninergique (voir également Zhou et Azmitia, 1983, 1984, 1986). Ainsi, la destruction partielle des afférences de l'hippocampe dorsal (par injection d'une neurotoxine sérotoninergique, la 5,7 DHT) a induit en 14 jours, une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (immunohistochimie) par des neurones cibles non-sérotoninergiques du gyrus denté et de l'aire CA3 de l'hippocampe dorsal (Patel et al., 1996). De façon très intéressante, les fibres sérotoninergiques épargnées par la neurotoxine ont démontré leur capacité à déclencher la croissance de leurs axones afin de maintenir un contrôle sérotoninergique sur l'hippocampe dorsal (Zhou and Azmitia, 1983, 1984, 1986). Il reste néanmoins une incertitude sur le rôle joué par les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans cet effet. Nous avons repris le protocole de dénervation sérotoninergique partielle de l'hippocampe dorsal de Patel et al., (1996) et nous l'avons validé en montrant que la concentration en sérotonine tissulaire était significativement diminuée dans les régions de projections étudiées (les hippocampes et le cortex cingulaire).

Notre analyse par autoradiographie *in vitro* au [<sup>18</sup>F]MPPF a montré une augmentation significative de cette fixation, spécifiquement au niveau de l'hippocampe dorsal, confirmant les résultats obtenus par Patel en 1996 avec une technique immunohistochimique. L'hippocampe dorsal possède donc en son sein des mécanismes compensatoires propres, faisant suite à une perte d'afférences d'origine neurotoxique (dénervation par 5,7 DHT ou neurotoxicité des peptides amyloïdes). Selon la "voie trisynaptique" de l'hippocampe (Fig. 66), des neurones du cortex entorhinal envoient (1) des afférences, par la voie perforante, sur les neurones granulaires du gyrus denté, qui connectent (2), via les fibres moussues, les neurones pyramidaux de l'aire CA3, ceux-ci projetant (3), par l'intermédiaire des fibres collatérales de Schaffer, leur axones vers l'aire CA1 (Scharfman, 2007). Nous pourrions émettre l'hypothèse que, dans notre modèle, des neurones pyramidaux de l'aire CA3 ("neurones cibles") ont pu surexprimer des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> suite à la perte d'afférences constituée par la neurotoxicité des peptides sur les neurones granulaires du gyrus denté. Nos résultats ont notamment montré une augmentation modérée de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans l'aire CA3. Il est également envisageable que des neurones granulaires aient réagit



par "sprouting". Cependant, le délai de 14 à 21 jours, nécessaire à l'observation d'un "sprouting" dans l'étude de Patel et al. (1996), ne correspond pas à l'expression transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> à 7 jours dans notre étude. L'hypothèse d'un sprouting nous paraît donc la moins probable.



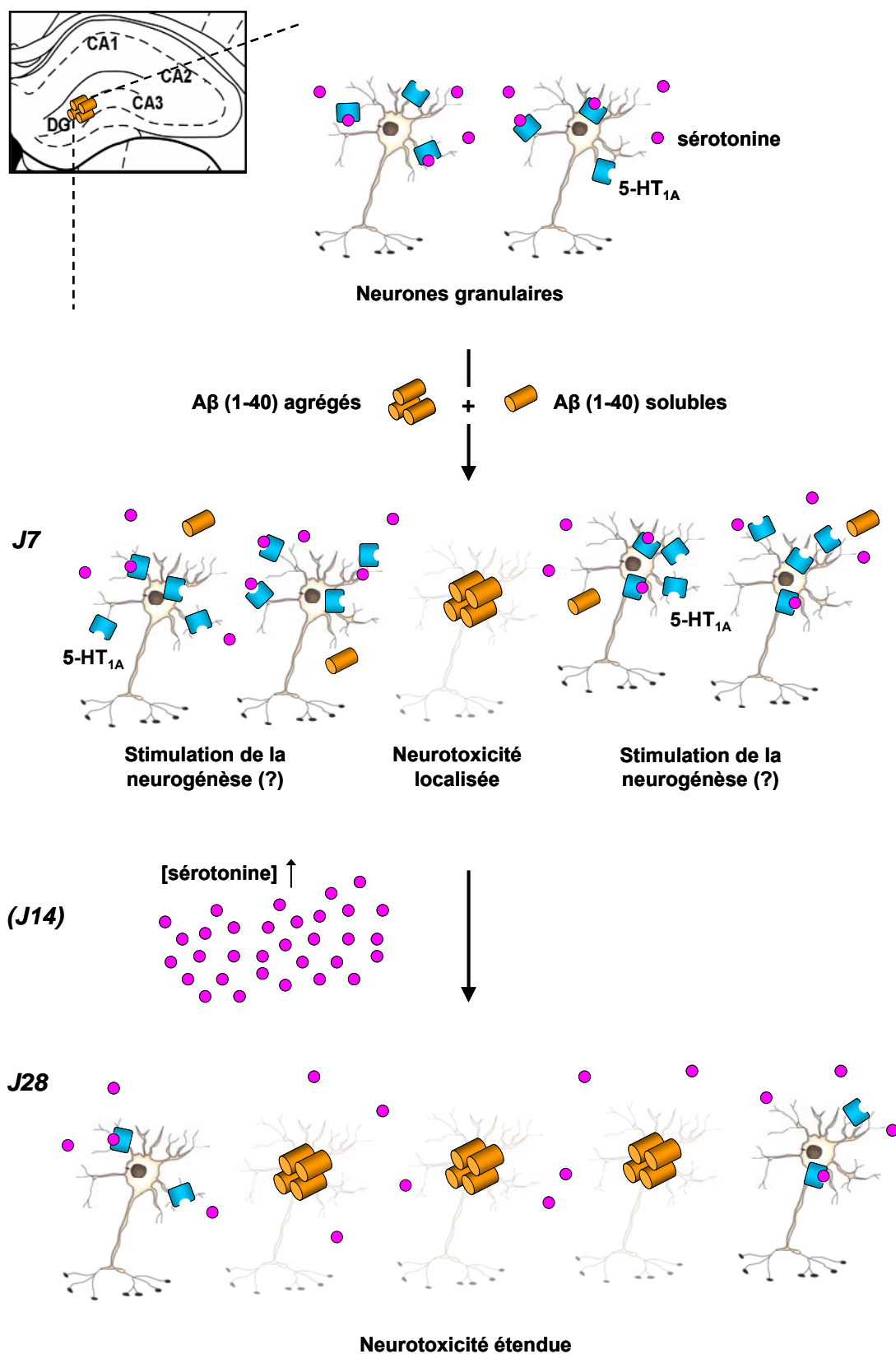
**Figure 66.** Anatomie de l'hippocampe de rat illustrant la "voie trisynaptique". EC, cortex entorhinal; pp, voie perforante; DG, gyrus denté; H, hilus; mf, fibres moussues; CA3, CA2, CA1, cornes d'Ammon; S, subiculum; sm, stratum moléculaire; sg, stratum granulosum; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum; sc, collatérales de Schaffer (d'après le site web de l'Université de Genève ([www.unige.ch](http://www.unige.ch))).

### **b. Une neurogénèse hippocampique ?**

Nous proposons une seconde hypothèse neuronale à l'augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. La couche granulaire du gyrus denté est l'une des régions du cerveau où l'existence d'une neurogénèse a été bien décrite (voir Altman et Das, 1965; Gould, 1999 pour revue). Chez les modèles de souris transgéniques de la MA, la neurogénèse est sujette à controverse. Alors qu'un grand nombre d'études a rapporté une diminution de la neurogénèse chez différentes lignées transgéniques (Dong et al., 2004; Donovan et al., 2006; Feng et al., 2001; Haughey et al., 2002; Wang et al., 2004; Wen et al., 2002), quelques autres ont démontré une augmentation de la prolifération et de la différenciation neuronale (Jin et al., 2004; Lopez-Toledano et Shelanski, 2007). Cette augmentation de la neurogénèse a pu être observée chez des souris transgéniques relativement jeunes (3 mois), en comparaison des



études faisant ressortir une diminution de la neurogénèse qui ont constamment été effectuées chez des souris âgées, pouvant expliquer les différences constatées. La neurogénèse pourrait ainsi être précocement augmentée, puis elle serait par la suite dépassée par les atteintes induites par les peptides A $\beta$  notamment. Ce concept émergent d'une régulation transitoire de la neurogénèse pourrait s'appliquer à nos résultats, les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> étant exprimés par des neurones granulaires nouvellement créés. Une étude récente a montré que les peptides A $\beta$  (1-40) solubles ont la capacité de stimuler la différenciation neuronale (neurogénèse) de cellules multipotentes (neurales) *in vitro* (Chen et Dong, 2008). Ainsi, dans notre modèle, il est envisageable qu'une petite proportion de peptides A $\beta$  (1-40) ait été injectée sous forme soluble, ayant la capacité de stimuler la neurogénèse au niveau du gyrus denté de l'hippocampe dorsal (**Fig. 67**). Cependant, nos expériences montrant une augmentation de la densité de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, 7 jours après l'injection unilatérale de peptides A $\beta$  (1-40) au niveau du striatum, peuvent difficilement être expliquées par une neurogénèse, étant donné l'absence de données sur l'existence d'un tel mécanisme dans cette structure cérébrale. D'autre part, il a été montré qu'une augmentation de la concentration en sérotonine tissulaire pouvait réprimer l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> neuronaux (Nishi et Azmitia, 1999; Whitaker-Azmitia et al., 1987). Ainsi, l'augmentation de la concentration en sérotonine tissulaire que nous observons 14 jours après l'injection des peptides, pourrait inhiber l'expression des 5-HT<sub>1A</sub> neuronaux, se retrouvant ainsi à leur niveau "basal".



**Figure 67.** Représentation schématique de l'hypothèse d'une activation de la neurogénèse par des peptides Aβ (1-40) solubles, 7 jours après l'injection, puis d'une neurotoxicité induite par l'agrégation des peptides (28 jours post-injection). L'augmentation de la concentration en sérotonine tissulaire 14 jours après l'injection des peptides reste inexplicée.

### **c. Une expression astrocytaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> ?**

Une autre hypothèse précisant la surexpression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> mérite d'être mentionnée: celle impliquant les astrocytes. L'existence d'une expression astrocytaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> a fait l'objet de multiples controverses. Whitaker-Azmitia et al. (1993) a démontré, par immunohistochimie, que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pouvaient être co-localisés avec la GFAP dans l'hippocampe de rat. En contradiction avec ces résultats, Kia et al. (1996a), utilisant un anticorps dirigé contre un autre domaine de la protéine 5-HT<sub>1A</sub>, n'a pas pu mettre en évidence de marquage glial dans le cerveau adulte de rat. Par la suite, Hirst et al. (1998) ont démontré l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT<sub>1A</sub> au niveau d'astrocytes adultes et une expression protéique de récepteurs incapables de lier des agonistes 5-HT<sub>1A</sub>, c'est-à-dire probablement dans un état non-fonctionnel. Patel et Zhou (2005) ont émis l'hypothèse qu'une protéolyse du récepteur aurait lieu dans les astrocytes matures, pouvant expliquer les différences de marquage immunohistochimique constatés avec des anticorps dirigés contre différentes parties de la protéine. Cependant, dans cette étude, ils ont pu détecter une expression astrocytaire de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> fonctionnels à un stade postnatal du développement du rat (Wilson et al., 1998). En effet, les récepteurs étaient capables de stimuler la production de S100 $\beta$ , une protéine spécifique aux astrocytes (Moore, 1965). Ainsi, l'expression astrocytaire de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> pourrait être restreinte à des astrocytes immatures, en développement.

Si l'on considère notre modèle d'injection de peptides A $\beta$  (1-40), il est possible que la réaction astrocytaire intense, constatée au niveau du site d'injection après une semaine, soit la source de la surexpression de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (**Fig. 68**). Ainsi, elle constituerait un mécanisme compensatoire précoce où les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> auraient la capacité de stimuler la production de S100 $\beta$ . Il a été rapporté que le S100 $\beta$  pouvait stimuler la croissance de neurones sérotoninergiques (Azmitia et al., 1990, 1992; Whitaker-Azmitia et al., 1990a,b) et agir comme un stimulateur de la croissance neuritique de neurones non-sérotoninergiques (Marshak, 1990). De plus, des études ont montré que la gliose réactionnelle, associée à la perte neuronale dans la MA, pouvait être la source d'une augmentation de la concentration en S100 $\beta$  ayant pour but de stimuler la prolifération neuritique des neurones épargnés (Hertz, 1989; Marshak, 1990). D'autre part, une étude *post-mortem* récente a montré une augmentation de la prolifération de cellules gliales au niveau de l'hippocampe, atrophié, de patients atteints de la MA à un stade prédéméntiel, la prolifération neuronale étant inchangée,

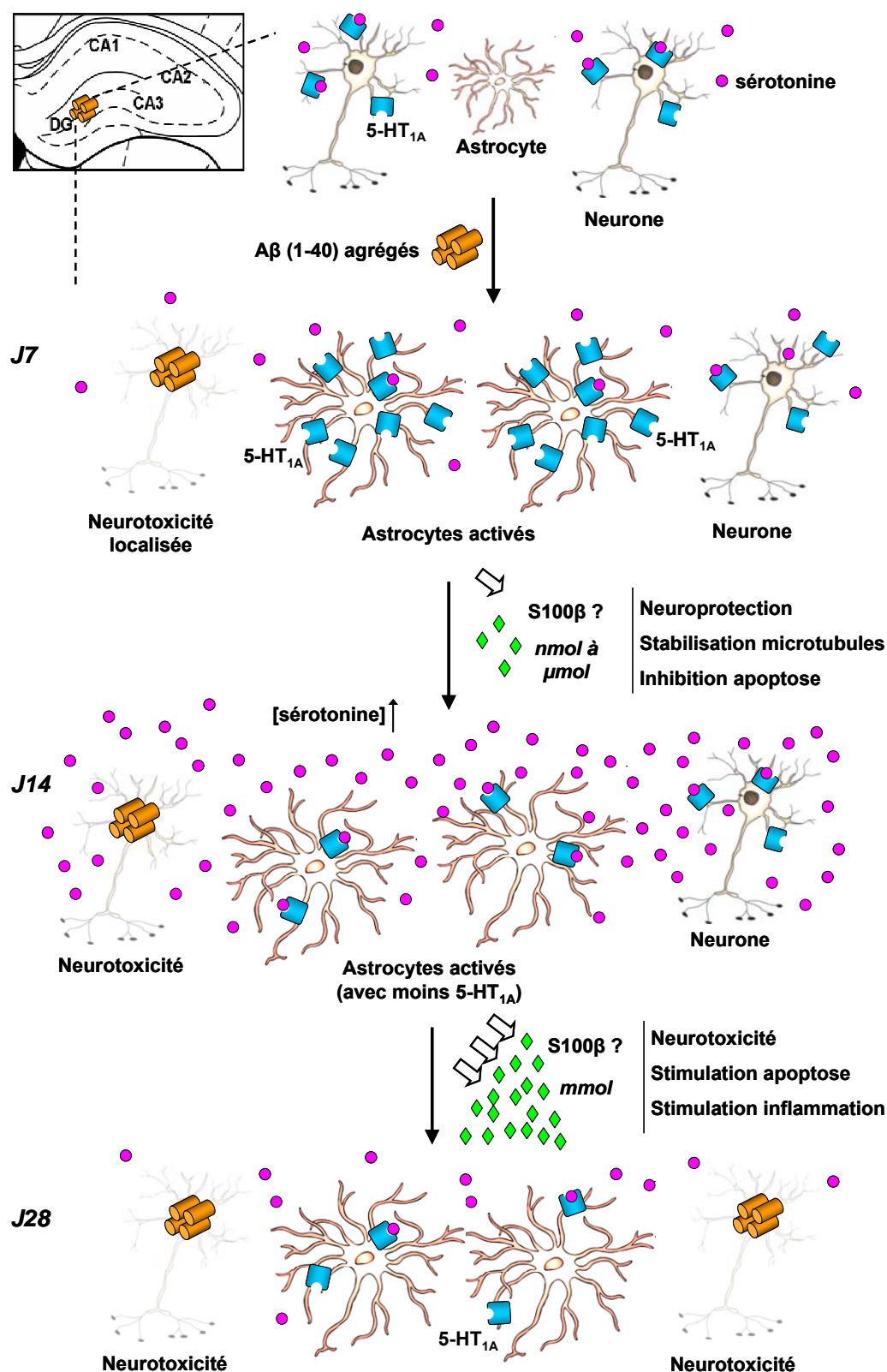
en comparaison d'une population de témoins appariés en âge (Boekhoorn et al., 2006). Cette conception est particulièrement adaptée à notre modèle et vient renforcer l'hypothèse d'une surexpression astrocytaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>. De plus, il a été démontré que des astrocytes arrivés à maturation perdaient la fonctionnalité de leurs récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (Whitaker-Azmitia et Azmitia, 1986). Ainsi, il est envisageable que ce phénomène ait eu lieu à 14 jours post-injection, expliquant ainsi le retour à un niveau de base en récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, et ce, malgré la constatation d'une réaction astrocytaire similaire à celle observée à 7 jours post-injection. Venant conforter l'hypothèse astrocytaire, les résultats des expériences d'injection de peptides Aβ (1-40) dans le striatum, région très faiblement pourvue en récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, révèlent une augmentation de la fixation du [<sup>18</sup>F]MPPF 7 jours après l'injection. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour identifier clairement la localisation des 5-HT<sub>1A</sub> surexprimés, et caractériser la fonctionnalité d'éventuels récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> astrocytaires.

## **7. La surexpression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> est transitoire**

A notre connaissance, les études qui ont évalué les conséquences de l'injection exogène de peptides amyloïdes dans le cerveau de rats sains se sont intéressées à un temps précis après l'injection. Nos travaux sont les premiers à s'intéresser aux effets longitudinaux de l'injection intrahippocampique de peptides Aβ (1-40) préagrégés sur, d'une part, l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et sur, d'autre part, la neuroanatomie régionale. De manière intéressante dans notre modèle, la surexpression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> s'est révélée être temporaire (7 jours), alors que la présence des peptides Aβ (1-40) agrégés a été constatée à tous les temps (3, 7, 14, 28 jours). De plus, l'analyse des conséquences neuroanatomiques, par les différents marqueurs histologiques, nous a permis de constater que l'état lésionnel de l'hippocampe dorsal est globalement identique à 7 et 14 jours post-injection, avec une intense réaction astrocytaire accompagnée d'une perte neuronale glutamatergique. Un résultat notable est l'observation, par marquage cellulaire au rouge neutre, d'une neurotoxicité des peptides Aβ (1-40) à distance du lieu de leur injection. En effet, jusqu'à 14 jours après l'injection, la réduction de l'épaisseur de la couche granulaire du gyrus denté représente 563 μm de diamètre environ. Puis elle s'étend latéralement à 28 jours post-injection pour occuper un diamètre de 1,5 mm. La réaction astrocytaire a normalement pour but de former une cicatrice protectrice entourant le site de lésion pour délimiter un "sanctuaire" neurotoxique (Maeda et al., 2007b). Malgré la

présence d'une réaction astrocytaire dans notre modèle, tout se passe comme si la neurotoxicité des peptides A $\beta$  (1-40) surpassait les mécanismes de compensation au cours du temps.

L'analyse longitudinale de notre modèle nous permet de proposer un enchaînement de mécanismes. Le premier se situe après 7 jours et concerne la surexpression de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> dans l'hippocampe dorsal. Une semaine plus tard (à 14 jours post-injection), la concentration tissulaire en sérotonine dans l'hippocampe dorsal est augmentée de 52,3%. Finalement, 28 après l'injection des peptides A $\beta$  (1-40), la perte de neurones granulaires du gyrus denté est amplifiée. L'augmentation de la concentration en sérotonine tissulaire dans l'hippocampe dorsal 14 jours après l'injection des peptides nous pose des problèmes d'interprétation. Haring et al. (1993) ont montré par immunohistochimie que lorsque la concentration en sérotonine tissulaire est augmentée dans l'hippocampe, il existe une augmentation concomitante de la synthèse de S100 $\beta$  par les astrocytes. Nous émettons l'hypothèse que, dans notre modèle, des astrocytes activés exprimant des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> (7 jours après l'injection) ont déclenché un signal destiné à augmenter la disponibilité en sérotonine (14 jours après l'injection) afin de stimuler la production astrocytaire de S100 $\beta$ . La S100 $\beta$  est connue pour ses propriétés neuroprotectrices, stabilisatrices des microtubules et inhibitrices de l'apoptose, à des concentrations de l'ordre du micro ou nanomolaire (Nishi et al., 1997; McAdory et al., 1998). Néanmoins, comme l'a décrit Ramos et al. (2004), lorsqu'une importante réaction astrocytaire a lieu, le S100 $\beta$  est produit à des concentrations de l'ordre du millimolaire qui sont connues pour stimuler l'apoptose et l'inflammation (Hu et al., 1997; Lam et al., 2001) (28 jours après l'injection). Appliquer cette théorie longitudinale à notre modèle est tentant (**Fig. 68**), mais il est clair que nous manquons d'informations pour aller dans ce sens. Nous ne pouvons, à ce stade d'avancement des expériences, qu'émettre des hypothèses. Des questions demeurent quant à la spécificité des phénomènes compensatoires que nous avons observés avec des peptides amyloïdes A $\beta$  (1-40) uniquement.



**Figure 68.** Schéma représentant "l'hypothèse astrocytaire". Sept jours après l'injection de peptides  $A\beta$  (1-40) agrégés, les récepteurs  $5-HT_{1A}$  sont surexprimés par des astrocytes activés. La concentration en sérotonine tissulaire est augmentée, 14 jours après l'injection. Celle-ci stimulerait, par l'intermédiaire des récepteurs  $5-HT_{1A}$ , la production de la protéine astrocytaire  $S100\beta$  possédant des propriétés neuroprotectrices ( $nM$  ou  $\mu M$ ). La suractivation de cette voie conduirait à une surproduction de  $S100\beta$  devenant neurotoxique ( $mM$ ).

## 8. Et les autres formes de peptides amyloïdes ?

Au cours de ces travaux, nous nous sommes concentrés sur les effets de l'injection des peptides A $\beta$  (1-40). Néanmoins, les plaques amyloïdes chez l'homme sont majoritairement constituées de l'accumulation de peptides A $\beta$  (1-40) et A $\beta$  (1-42) (Glennner et al., 1984; Masters et al., 1985). Nous avons testés les effets de l'injection de peptides A $\beta$  (1-42), en suivant exactement la même procédure (étude 7 jours après l'injection). Cependant, nous n'avons pas trouvé, dans ces conditions, de modifications de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF dans l'hippocampe dorsal ou dans ses sous-régions. La surexpression des récepteurs 5-HT $_{1A}$  est donc spécifique des peptides A $\beta$  (1-40). Nous n'avons pas encore d'explication à apporter à ce résultat. Un plus grand nombre d'expériences devrait être réalisé pour confirmer ou infirmer cette tendance.

Nous avons également étudié un modèle d'injection intra-cérébro-ventriculaire de peptides A $\beta$  (25-35), bien caractérisé pour sa neurotoxicité hippocampique (Stepanichev et al., 2004; et collaboration avec le Dr Sandor Arancibia de l'INSERM U710). La fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF *in vitro* au niveau du noyau du raphé dorsal (NRD), de l'hippocampe ventral (Hipp Ventr), de l'hippocampe dorsal (Hipp Dors) et du cortex cingulaire (Cing) n'a pas été modifiée, 28 jours après l'injection i.c.v. des peptides. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de modification du niveau d'expression des récepteurs 5-HT $_{1A}$  dans ce modèle, contrairement au modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40).

(i) La nature des peptides injectés est différente (A $\beta$  (25-35) versus A $\beta$  (1-40)). Cependant, ces deux formes de peptides ont montré leur capacité à s'agréger pour former des plaques amyloïdes.

(ii) Le mode d'injection (intrahippocampique vs intracérébroventriculaire) peut expliquer les différences d'effets observés. En effet, l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) a ciblé le gyrus denté alors que l'injection des peptides A $\beta$  (25-35) a disséminé les agrégats.

(iii) Enfin, le délai d'étude post-injection est différent (7 jours vs 28 jours). Dans le modèle d'injection intrahippocampique des peptides A $\beta$  (1-40), l'augmentation de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF est uniquement transitoire. Il serait intéressant de pouvoir évaluer la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF au cours du temps, dans le modèle d'injection i.c.v.

## F. Conclusion et perspectives

Le modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40) chez le rat parvient à reproduire une augmentation transitoire de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, 7 jours après l'injection. Le marquage autoradiographique *in vitro* au [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, un agoniste des récepteurs 5-HT $_{1A}$ , n'est, lui, pas modifié 7 jours après l'injection des peptides, démontrant que les récepteurs 5-HT $_{1A}$  surexprimés ne sont pas couplés aux protéines G, donc probablement dans un état (transitoire) non-fonctionnel. L'évaluation longitudinale des conséquences neuroanatomiques de l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) dans l'hippocampe dorsal, et plus particulièrement le gyrus denté, a révélé une intense réaction astrocytaire et une mort des neurones granulaires glutamatergiques (7 et 14 jours post-injection). D'autre part, à 14 jours post-injection, la concentration en sérotonine tissulaire est augmentée au niveau de l'hippocampe dorsal. Enfin, la neurotoxicité induite par les peptides agrégés s'étend dans la latéralité du gyrus denté (28 jours post-injection). A partir de ces résultats obtenus par évaluation longitudinale, nous avons proposé différents mécanismes compensatoires pouvant expliquer l'augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT $_{1A}$  et ayant des conséquences sur les thérapeutiques visant à moduler ces récepteurs.

Les différents résultats que nous avons obtenus grâce à l'évaluation longitudinale de ce modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40) nous ont permis de proposer des hypothèses mais ne concluent pas sur la nature réelle des mécanismes compensatoires effectivement mis en jeu. Ainsi, nous ne pouvons émettre que des hypothèses qui seront testées lors de travaux ultérieurs dans notre laboratoire.

Contrairement aux résultats obtenus par imagerie TEP clinique, nos expériences réalisées en préclinique, par imagerie *in vivo*, n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT $_{1A}$ . Il sera intéressant d'injecter une plus grande quantité de peptides amyloïdes pour tenter d'atteindre une significativité par analyse microPET *in vivo*.

Nos résultats ne nous ont pas permis de déterminer la localisation neurale des récepteurs 5-HT $_{1A}$  surexprimés. Il sera important de pouvoir disposer d'anticorps anti-5-HT $_{1A}$  fiables afin d'évaluer une colocalisation des récepteurs 5-HT $_{1A}$  et de la GFAP par double marquage immunohistochimique. L'immunohistochimie des récepteurs 5-HT $_{1A}$  couplée à la



microscopie électronique permettrait également de déterminer la nature de la population neurale portant ces récepteurs surexprimés.

Nos résultats suggèrent indirectement que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> surexprimés ne seraient pas couplés aux protéines G. L'évaluation du couplage fonctionnel des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> aux protéines G en mesurant la liaison du [<sup>35</sup>S]GTPγ par mesure autoradiographique permettra d'évaluer si l'évolution de la plaque amyloïde s'accompagne d'une modification hippocampique de la proportion entre récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> couplés et non couplés. D'autre part, si la présence astrocytaire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> était démontrée, un marquage immunohistochimique de l'expression de la protéine S100β apporterait des informations sur l'activation astrocytaire. L'utilisation de la microdialyse couplée à l'HPLC avec détection électrochimique, au niveau du site d'injection, permettrait de recueillir puis doser la S100β dans le même but.

Nos dosages de sérotonine, uniquement tissulaires, ne permettent pas de distinguer les différents compartiments, intracellulaires et extracellulaires. Nous chercherons un mécanisme expliquant l'augmentation de la sérotonine en mesurant de manière dynamique la concentration extracellulaire de sérotonine par microdialyse couplée à l'HPLC et détection électrochimique aux différents temps post-injection, en implantant une sonde sur le site d'injection. Il est possible que la concentration de sérotonine extracellulaire soit modifiée précocément, alors que la concentration tissulaire totale ne soit pas encore modifiée.

Ces approches pluridisciplinaires *in vivo* et *in vitro* apporteront un rationnel préclinique en faveur de l'exploration de la neurotransmission sérotoninergique 5-HT<sub>1A</sub> dans la MA, transposable cliniquement tant dans des perspectives thérapeutiques que diagnostiques.

*Ce travail fait l'objet d'une publication: "Verdurand M, Bérod A, Le Bars D, Zimmer L (2008). Effects of amyloid-β peptides on the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat hippocampus. Neurobiol Aging (en soumission)".*

# Conclusion générale

Les travaux effectués au cours de cette thèse CIFRE se sont articulés en 3 axes distincts partageant un objectif commun, le développement des méthodologies de l'imagerie TEP appliquées au diagnostic et à l'exploration sérotoninergique de la MA.

Dans une première partie, méthodologique, nous avons montré que la synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB à partir des automates de synthèse Bioscan® est possible. Le système de synthèse est entièrement automatisé et permet d'effectuer une synthèse du [ $^{11}\text{C}$ ]PIB simple et reproductible. Une personne non spécialisée en radiochimie peut réaliser ces radiosynthèses, après une courte formation sur l'utilisation des automates. L'approche que nous avons développée permet de synthétiser ce radiotracer TEP plusieurs fois par jour si l'activité préclinique et/ou clinique le nécessite. A cet égard, des tests sont toujours en cours pour évaluer la fiabilité des deux automates lors de synthèses répétées.

Dans une deuxième partie, nous avons pu réaliser le radiomarquage d'une molécule antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05. Cependant, les expériences de validation biologique réalisées chez différentes espèces, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que le [ $^{18}\text{F}$ ]12ST05 ne se fixe pas spécifiquement sur les récepteurs 5-HT<sub>6</sub>. Le développement de radiotraceurs des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> reste un objectif majeur, qui apporterait un outil supplémentaire pour l'exploration des fonctions sérotoninergiques cérébrales *in vivo*, et trouverait de multiples applications thérapeutiques potentielles, notamment dans l'amélioration des troubles cognitifs et la MA.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons démontré que le modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40) chez le rat parvient à reproduire une augmentation transitoire de la fixation du [ $^{18}\text{F}$ ]MPPF, observée chez les patients MCI. Le marquage autoradiographique *in vitro* au [ $^{18}\text{F}$ ]F15599, un agoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, n'est, lui, pas modifié 7 jours après l'injection des peptides, démontrant que les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> surexprimés ne sont pas couplés aux protéines G, donc probablement dans un état (transitoire)

non-fonctionnel. L'évaluation longitudinale des conséquences neuroanatomiques de l'injection des peptides A $\beta$  (1-40) dans l'hippocampe dorsal, et plus particulièrement le gyrus denté, a révélé une intense réaction astrocytaire et une mort des neurones granulaires glutamatergiques (7 et 14 jours post-injection). D'autre part, à 14 jours post-injection, la concentration en sérotonine tissulaire est augmentée au niveau de l'hippocampe dorsal. Enfin, la neurotoxicité induite par les peptides agrégés s'étend dans la latéralité du gyrus denté (28 jours post-injection). A partir de ces résultats obtenus par évaluation longitudinale, nous avons proposé différents mécanismes compensatoires pouvant expliquer l'augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et ayant des conséquences sur les thérapeutiques visant à moduler ces récepteurs. Les différents résultats que nous avons obtenus grâce à l'évaluation longitudinale de ce modèle d'injection intrahippocampique de peptides A $\beta$  (1-40) nous ont permis de proposer des hypothèses mais ne concluent pas sur la nature réelle des mécanismes compensatoires effectivement mis en jeu. Cependant, l'hypothèse d'une activation astrocytaire faisant intervenir les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et contribuant à la surexpression de ce type de récepteurs, 7 jours après l'injection des peptides, nous paraît très intéressante. Les travaux seront poursuivis dans notre laboratoire pour tenter, d'une part, d'établir la localisation astrocytaire de ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et, d'autre part, de mieux caractériser la fonctionnalité de ces récepteurs et les conséquences sur la thérapeutique à visée 5-HT<sub>1A</sub> qu'elle peut engendrer.

# Bibliographie

1. Adham N, Romanienko P, Hartig P, Weinshank RL, Branchek T (1992). The rat 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor is the species homologue of the human 5-hydroxytryptamine<sub>1D</sub> beta receptor. *Mol Pharmacol* 41:1-7.
2. Adham N, Kao HT, Schechter LE, Bard J, Olsen M, Urquhart D, Durkin M, Hartig PR, Weinshank RL, Branchek TA (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT<sub>1F</sub>): a fifth 5-HT<sub>1</sub> receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:408-12.
3. Aghajanian GK, Vandermaelen CP (1982). Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* 2:1786-92.
4. Ahmed M, Johnson CN, Jones MC, MacDonald GJ, Moss SF, Thompson M, et al. (2003). Novel compounds. WO patent 2003080580.
5. Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ (1992). Cell loss in the nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13:461-8.
6. Altman J, Das GD (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-35.
7. Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, Arendt A (1985). Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 14:1-14.
8. Arvidsson LE, Hacksell U, Milsson JL, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H (1981). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem* 8:921-3.
9. Assal F, Cummings JL (2002). Neuropsychiatric symptoms in the dementias. *Curr Opin Neurol* 15:445-50.
10. Azmitia EC, Buchan AM, Williams JH (1978). Structural and functional restoration by collateral sprouting of hippocampal 5-HT axons. *Nature* 274:374-6.
11. Azmitia EC, Dolan K, Whitaker-Azmitia PM (1990). S100 $\beta$  but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res* 516:354-6.
12. Azmitia EC, Griffin WST, Marshak DK, Van Eldik LJ, Whitaker-Azmitia PM (1992). S100 $\beta$  and serotonin; a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 94:459-73.
13. Aznavour N, Rbah L, Léger L, Buda C, Sastre JP, Imhof A, Charnay Y, Zimmer L (2006a). A comparison of in vivo and in vitro neuroimaging of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in the cat brain. *J Chem Neuroanat* 31:226-32.
14. Aznavour N, Rbah L, Riad M, Reilhac A, Costes N, Descarries L, Zimmer L (2006b). A PET imaging study of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment. *Neuroimage* 33:834-42.
15. Aznavour N, Zimmer L (2007). [<sup>18</sup>F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology* 52:695-707.

16. Baker KG, Halliday GM, Törk I (1990). Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 301:147-61.
17. Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268:23422-6.
18. Baron JC, Chételat G, Desgranges B, Perchey G, Landeau B, de la Sayette V, Eustache F (2001). *In vivo* mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 14:298-309.
19. Barthe N (2007). L'imagerie bêta haute résolution. *Médecine Nucléaire* 31:193-201.
20. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217:408-17.
21. Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature (Lond)* 361:31-9.
22. Boess FG, Riemer C, Bös M, Bentley J, Bourson A, Sleight AJ (1998). The 5-hydroxytryptamine<sub>6</sub> receptor-selective radioligand [<sup>3</sup>H]Ro 63-0563 labels 5-hydroxytryptamine receptor binding sites in rat and porcine striatum. *Mol Pharmacol* 54:577-83.
23. Bös M, Sleight AJ, Godel T, Martin JR, Riemer C, Stadler H (2001). 5-HT<sub>(6)</sub> receptor antagonists: lead optimisation and biological evaluation of N-aryl and N-heteroaryl 4-amino-benzene sulfonamides. *Eur J Med Chem* 36:165-78.
24. Bowen DM, Davison AN (1980). Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia. *Psychol Med* 10:315-9.
25. Bowen DM, Najlerahim A, Procter A, Francis P, Murphy E (1989). Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of late life. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9504-8.
26. Bowen DM, Francis PT, Chessell IP, Webster MT (1994). Neurotransmission-the link integrating Alzheimer research? *Trends Neurosci* 17:149-50.
27. Braak H, Braak E (1991). Morphological changes in the human cerebral cortex in dementia. *J Hirnforsch* 32:277-82.
28. Branchek T, Adham N, Macchi M, Kao HT, Hartig PR (1990). [<sup>3</sup>H]-DOB(4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine) and [<sup>3</sup>H]ketanserin label two affinity states of the cloned human 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor. *Mol Pharmacol* 38:604-9.
29. Buhot MC, Martin S, Sequ L (2000). Role of serotonin in memory impairment. *Ann Med* 32:210-21.
30. Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB (2001). In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358:461-7.
31. Chazal G, Ralston HJ 3<sup>rd</sup> (1987). Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructure analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J Comp Neurol* 259:317-29.
32. Chen CP, Alder JT, Bowen DM, Esiri MM, McDonald B, Hope T, Jobst KA, Francis PT (1996). Presynaptic serotonergic markers in community-acquired cases of Alzheimer's disease: correlations with depression and neuroleptic medication. *J Neurochem* 66:1592-8.
33. Chen Y, Dong C (2008). Aβ<sub>40</sub> promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ* (sous presse, consultable en ligne).

34. Clawges HM, Depree KM, Parker EM, Graber SG (1997). Human 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes exhibit distinct G protein coupling behaviours in membranes from Sf9 cells. *Biochemistry* 36:12930-8.
35. Cliffe IA, Brightwell CI, Fletcher A, Forster EA, Mansell HL, Reilly Y, Routledge C, White AC (1993). (S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide [(S)-WAY-100635]: a selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Med Chem* 36:1509-10.
36. Cliffe IA (2000). A retrospect on the discovery of WAY-100635 and the prospect for improved 5-HT<sub>(1A)</sub> receptor PET radiolignads. *Nucl Med Biol* 27:441-7.
37. Cole DC, Stock JR, Lennox WJ (2003). Indolylalkylamine derivatives as 5-hydroxytryptamine-6-lignads. WO patent 2003053433.
38. Cole DC, Lennox WJ, Lombardi S, Ellingboe JW, Bernotas RC, Tawa GJ, et al. (2005a). Discovery of 5-arylsulfonamido-3-(pyrrolidin-2-ylmethyl)-1H-indole derivatives as potent, selective 5-HT<sub>6</sub> receptor agonists and antagonists. *J Med Chem* 48:353-6.
39. Cole DC, Stock JR, Lennox WJ, Bernotas RC, Ellingboe JW, Leung L, et al. (2005b). Discovery of a potent, selective and orally active 5-HT<sub>6</sub> receptor agonist, WAY-181187. *230<sup>th</sup> ACS Natl Meet, Aug 28-Sept 1, Washington DC*. Abstract MEDI 17.
40. Cole DC, Lennox WJ, Stock JR, Ellingboe JW, Mazandarani H, Smith DL, et al. (2005c). Conformationally constrained N<sub>1</sub>-arylsulfonyltryptamine derivatives as 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 15:4780-5.
41. Collindridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collaterals-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334:33-46.
42. Compan V, Segu L, Buhot MC, Daszuta A (1998). Differential effects of serotonin (5-HT) lesions and synthesis blockade on neuropeptide-Y immunoreactivity and 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B/1D</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor binding sites in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 795:264-76.
43. Costes N, Reilhac A (2006). Evaluation of PET tracer binding recovered by partial volume correction technique in case of hippocampic atrophy. In: *IEEE Nuclear Science Symposium and Medical Imaging Conference; 2006*.
44. Coyle JT, Price DL, De Long MR (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219:1184-90.
45. Cross AJ, Crow TJ, Ferrier IN, Johnson JA (1986). The selectivity of the reduction of serotonin S<sub>2</sub> receptors in Alzheimer-type dementia. *Neurobiol Aging* 7:3-7.
46. Curcio CA, Kemper T (1984). Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:359-68.
47. Dahlström A, Fuxe K (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398-9.
48. D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer R, Mayeux R, Price DL, Snyder SH (1987). Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 22:229-36.
49. Dawson LA, Nguyen HQ, Li P (2000). *In vivo* effects of the 5-HT<sub>6</sub> antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. *Brit J Pharmacol* 130:23-6.
50. Dawson LA, Nguyen HQ, Li P (2001). The 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist SB-271046 selectively enhances excitatory neurotransmission in the rat frontal cortex and hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 25:662-8.

51. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Watzet A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158-65.
52. de Montigny C, Blier P (1992). Potentiation of 5-HT neurotransmission by short-term lithium: *in vivo* electrophysiological studies. *Clin Neuropharmacol* 15:610-1.
53. Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* 207:239-54.
54. Descarries L, Mechawar N (2000). Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125:27-47.
55. Dompert WU, Glaser T, Traber J (1985). 3H-TVX Q 7821: Identification of 5-HT<sub>1</sub> binding sites as target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn-schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328:467-70.
56. Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127:601-9.
57. Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ (2006). Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 495:70-83.
58. Duyckaerts C, Uchirara T, Seilhean D, He Y, Hauw J-J (1997). Dissociation of Alzheimer type pathology in a disconnected piece of cortex. *Acta Neuropathol (Berl.)* 93:501-7.
59. East SZ, Burnet PW, Leslie RA, Roberts JC, Harrison PJ (2002). 5-HT<sub>6</sub> receptor bonding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: autoradiographic studies with [<sup>125</sup>I]SB-258585. *Synapse* 45:191-9.
60. El Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Vergé D, Daval G, Gozlan H, Hamon M (1990). Production of specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 118:189-92.
61. Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* 335:358-60.
62. Feldberg W, Meyers RD (1964). Effects on temperature of amines injected into the cerebral ventricles. A new concept of temperature regulation. *Physiol* 173:226-31.
63. Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001). Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911-26.
64. Filla SA, Flaugh ME, Gillig JR, Heinz LJ, Krushinski JHJr, Liu B, et al. (2002). Preparation of benzenesulfonic acid indol-5-yl esters as antagonists of the 5-HT<sub>6</sub> receptor. WO patent 2002060871.
65. Flicker C, Ferris SH, Reisberg B (1991). Mild cognitive impairment in the elderly: predictor of dementia. *Neurology* 41:1006-9.
66. Fone KC, Marsden CA, Bentley JC, Woolley ML (2002). *Abstract from 5<sup>th</sup> IUPHAR Satellite Meeting on Serotonin (P77)*.
67. Francis PT, Pangalos MN, Stephens PH, Bartlett JR, Bridges PK, Malizia AL, Neary D, Proctor AW, Thomas DJ, Bowen DM (1993). Antemortem measurements of neurotransmission:

Possible implications for pharmacotherapy of Alzheimer's disease and depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:80-4.

68. Frautschy SA, Cole GM, Baird A (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol* 140:1389-99.
69. Furumoto S, Okamura N, Ishikawa Y, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Maruyama M, Akatsu H, Suemoto T, Yamamoto T, Arai H, Sawada T, Iwata R, Yanai K, Kudo Y (2005). [<sup>11</sup>C]BF227: A new <sup>11</sup>C-labeled 2-ethenylbenzoxazole derivative for amyloid- $\beta$  plaques imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:S161.
70. Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4:1002-12.
71. Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, et al. (1995). The 5-HT<sub>4</sub> receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J* 14:2806-15.
72. Gérard C, el Mestikawy S, Lebrand C, Adrien J, Ruat M, Traiffort E, Hamon M, Martres MP (1996). Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *Synapse* 23:164-73
73. Gérard C, Martres NP, Lefèvre K, Miquel MC, Vergé D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M, el Mestikawy S (1997). Immuno-localization of serotonin 5-HT<sub>6</sub> receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res* 746:207-19.
74. Ginovart N, Hassoun W, Le Bars D, Weissmann D, Leviel V (2000). *In vivo* characterization of p-[<sup>18</sup>F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635 for visualization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Synapse* 35:192-200.
75. Giovanelli L, Casamenti F, Scali C, Bartolini L, Pepeu G (1995). Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience* 66:781-92.
76. Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2:357-69.
77. Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
78. Gomez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutiérrez R (2005). Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* 25:6939-46.
79. Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM (2002). Alteration of cholinergic, excitatory amino acid and neuropeptide markers in the septum-diagonal band complex following injections of fibrillar  $\beta$ -amyloid protein into the retrosplenial cortex of the rat. *Eur J Anat* 6:58-71.
80. Gonzalo-Ruiz A, Gonzalez I, Sanz-Anquela JM (2003). Effects of  $\beta$ -amyloid protein on serotonergic, noradrenergic, and cholinergic markers in neurons of the pontomesencephalic tegmentum in the rat. *J Chem Neuroanat* 26:153-69.
81. Gould E (1999). Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacol* 21(2 Suppl.):46S-51S.
82. Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M (1983). Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: <sup>3</sup>H-PAT. *Nature* 305:140-2.
83. Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M (1995). The selective 5-HT<sub>1A</sub> antagonist radioligand [<sup>3</sup>H]WAY 100635 labels both G-protein-couple and free 5-HT<sub>1A</sub> receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol* 288:173-86.
84. Greenamyre JT, Young AB (1989). Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10:1058-63.



85. Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416:396-400.
86. Guenette SY (2003). Mechanisms of Abeta clearance and catabolism. *Neuromolecular Med* 4:147-60.
87. Halliday GM, McCann HL, Pamphlett R, Brooks WS, Creasy H, McCusker E, Cotton RG, Broe GA, Harper CG (1992). Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol (Berl.)* 84:638-50.
88. Hamblin MW, Metcalf MA (1991). Primary structure and functional characterization of a human 5-HT<sub>1A</sub>-type serotonin receptor. *Mol Pharmacol* 40:143-8.
89. Hamon M, Doucet E, Lefèvre K, Miquel MC, Lanfumey L, Insausti R, Frechilla D, Del Rio J, Vergé D (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology* 21(Suppl.2):68S-76S.
90. Hardy JA, Allsop D (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
91. Haring JH, Hagan A, Olson J, Rodgers B (1993). Hippocampal serotonin levels influence the expression of S100 $\beta$  detected by immunocytochemistry. *Brain Res* 631:119-23.
92. Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 83:1509-24.
93. Heal DJ, Smith SL, Fisas A, Codony X, Buschmann H (2008). Selective 5-HT<sub>6</sub> receptor ligands: Progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Pharmacol Ther* 117:207-31.
94. Hen R (1992). Of mice and flies: commonalities among 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 4:160-5.
95. Hertz L (1989). Is Alzheimer's disease an anterograde degeneration originating in the brainstem and disrupting metabolic and functional interactions between neurons and glial cells? *Brain Res Rev* 14:335-53.
96. Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP (1998). Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes to adenylyl cyclase. *Brain Res Mol Brain Res* 61:90-9.
97. Hirst WD, Minton JA, Bromidge SM, Moss SF, Latter AJ, Riley G, Routledge C, Middlemiss DN, Price GW (2000). Characterization of [(125)I]-SB-258585 binding to human recombinant and native 5-HT(6) receptors in rat, pig and human brain tissue. *Br J Pharmacol* 130:1597-605.
98. Hirst WD, Abrahamsen B, Blaney FE, Calver AR, Aloj L, Price GW, Medhurst AD (2003). Differences in the central nervous system distribution and pharmacology of the mouse 5-hydroxytryptamine-6 receptor compared with rat and human receptors investigated by radioligand binding, site-directed mutagenesis, and molecular modeling. *Mol Pharmacol* 64:1295-308.
99. Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikström H, Arvidsson LA, Hackzell U, Nilsson JLG (1982). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, 8OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity. *J Neural Trans* 55:169-88.
100. Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* 577(Pt 1):5-15.

101. Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM (1986). Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> recognition sites. Apparent absence of 5-HT<sub>1B</sub> recognition sites. *Brain Res* 376:85-96.
102. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203.
103. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-54.
104. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ (1997). S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem* 69:2294-301.
105. Huiban M, Passchier J, Martarello L, Cunningham VJ, Jakobsen S, Gee AD (2006). [<sup>11</sup>C]GSK224558 as a potential PET ligand for the delineation of 5-HT<sub>6</sub> receptors. *NeuroImage* 31:T13.
106. Hume S, Hirani E, Opacka-Juffry J, Myers R, Townsend C, Pike V, Grasby P (2001). Effect of 5-HT on binding of [<sup>11</sup>C] WAY 100635 to 5-HT<sub>(1A)</sub> receptors in rat brain, assessed using *in vivo* microdialysis and PET after fenfluramine. *Synapse* 41:150-9.
107. Iqbal K, Van Praag HM (1995). The role of serotonin in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 5 Suppl:11-23.
108. Jacobs BL, Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
109. Jasper HH, Ajmone-Marsan C (1954). A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. *Ottawa: The National Research Council of Canada editors*.
110. Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA (2004). Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13363-67.
111. Johnston CA, Siderovski DP (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol* 72:219-30.
112. Jouvet M (1967). Recent findings in experimental insomnia in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 3:284.
113. Julius D, MacDermott AB, Axel R, Jessell TM (1988). Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241:558-64.
114. Kepe V, Barrio JR, Huang S-C, Ercoli L, Siddarth P, Shoghi-Jadid K, Cole GM, Satyamurthy N, Cummings JL, Small GW, Phelps ME (2006). Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:702-7.
115. Khawaja X (1995). Quantitative autoradiographic characterisation of the binding of [<sup>3</sup>H]WAY-100635, a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist. *Brain Res* 673:217-25.
116. Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Vergé D (1996a). Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* 46:697-708.
117. Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D (1996b). Immunocytochemical localization of serotonin 1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365:289-305.
118. Kowall NW, Beal MF (1991). Glutamate-, glutaminase- and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 29:162-7.
119. Kumar JS, Majo VJ, Hsiung SC, Millak MS, Liu KP, Tamir H, Prabhakaran J, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey RV (2006). Synthesis and *in vivo* validation of [0-methyl-<sup>11</sup>C]-2-[4-[4-(7-methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl]-4-methyl-2H-

- [1,2,4]triazine-3,5-dione: a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist positron emission tomography ligand. *J Med Chem* 49:125-34.
120. Kumar JS, Prabhakaran J, Majo VJ, Milak MS, Hsiung SC, Tamir H, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey RV (2007). Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist radioligand [0-methyl-11C]2-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-methyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)dione in nonhuman primates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:1050-60.
  121. Kumar JS, Mann JJ (2007) PET tracers for 5-HT<sub>(1A)</sub> receptors and uses thereof. *Drug Disco Today* 12:748-56.
  122. Kung MP, Frederick D, Mu M, Zhuang ZP, Kung HF (1995). 4-(2'-methoxy-phenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl-piperazine ([<sup>125</sup>I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-1A sites in rat brain: *in vitro* binding and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 272:429-37.
  123. Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Cohen ML, Baez M (1992). Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine<sub>2F</sub>) from rat stomach fundus. *Mol Pharmacol* 42:549-57.
  124. Lai MK, Tsang SW, Alder JT, Keene J, Hope T, Esiri MM, Fancis PT, Chen CP (2005). Loss of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the postmortem temporal cortex correlates with rate of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl.)* 179:673-7.
  125. Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ (2001). Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging* 22:765-72.
  126. Lanctôt KL, Hussey DF, Herrmann N, Black SE, Rusjan PM, Wilson AA, Houle S, Kozloff N, Verhoeff NP, Kapur S (2007). A positron emission study of 5-hydroxytryptamine-1A receptors in Alzheimer Disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 15:888-98.
  127. Lanfumey L, Hamon M (2000). Central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol* 27:429-35.
  128. Lanfumey L, Hamon M (2004). 5-HT<sub>1</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:1-10.
  129. Lauder JM, Krebs H (1978). Serotonin as differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci* 1:15-30.
  130. Lawlor BA (2004). Behavioral and psychological symptoms in dementia: the role of atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 65 (Suppl.11):5-10.
  131. Le Bars D, Villanueva L (1988). Electrophysiological evidence for the activation of descending inhibitory controls by nociceptive afferent pathways. *Prog Brain Res* 7:275-99.
  132. Le Bars D, Lemaire C, Ginovart N, Plenevaux A, Aerts J, Brihaye C, Hassaoun W, Leviel V, Mekshian P, Weissman D, Pujol JF, Luxen A, Comar D (1998). High-yield radiosynthesis and preliminary *in vivo* evaluation of p-[<sup>18</sup>F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nucl Med Biol* 25:343-50.
  133. Lee JM, Kowall N (1989). Evidence for neurofibrillary tangles (NFTs) in pontine 5-HAT neurons in Alzheimer's disease (AD). *Neurosci Abstr* 15:859.
  134. Léger L, Charnay Y, Hof PR, Bouras C, Cespuglio R (2001). Anatomical distribution of serotonin-containing neurons and axons in the central nervous system of the cat. *J Comp Neurol* 433:157-82.
  135. Leibowitz SF (1990). The role of serotonin in eating disorders. *Drugs* 39(Suppl.3):33-48.

136. Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, Zimmer L (2008). Synthesis, fluorine-18 labelling and radiopharmacological evaluation of F15599, a novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist. *J Nucl Med* 49 (Suppl 1):285P.
137. Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* 20:269-74.
138. Lima L, Laporte AM, Gaymard C, Spedding M, Mocaër E, Hamon M (1997). Atypical *in vitro* and *in vivo* binding of [<sup>3</sup>H]S-14506 to brain 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Neural Transm* 104:1059-75.
139. Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2007). Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw,Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229-40.
140. Lorke DE, Lu G, Cho E, Yew DT (2006). Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>6</sub> receptors in the prefrontal cortex of Alzheimer and normal aging patients. *BMC Neurosci* 27:7-36.
141. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, et al. (1993). A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-58.
142. Lu SY, Hong J, Musachio JL, Chin FT, Vermeulen ES, Wikström HV, Pike VW (2005). Alternative methods for labelling the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 1-[2-(4-fluorobenzoylamino)ethyl]-4-(7-methoxynaphthyl)piperazine (S14506), with carbon-11 or fluorine-18. *J Label Compd Radiopharm* 48:971-81.
143. Lucki I (1992). 5-HT<sub>1</sub> receptors and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 1:83-93.
144. Madjid N, Tottie EE, Lüttgen M, Meister B, Sandin J, Kuzmin A, Stiedl O, Ogren SO (2006). 5-Hydroxytryptamine 1A receptors blockade facilitates aversive learning in mice: interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 316:581-91.
145. Maeda J, Higuchi M, Inaji M, Ji B, Haneda E, Okauchi T, Zhang M-R, Suzuki K, Suhara T (2007b). Phase-dependent roles of reactive microglia and astrocytes in nervous system injury as delineated by imaging of peripheral benzodiazepine receptor. *Brain Res* 1157:100-11.
146. Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L (2006). Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol* 70:1013-21.
147. Marcos B, Gil-Bea FJ, Hirst WD, Garcia-Alloza M, Ramirez MJ (2006). Lack of localization of 5-HT<sub>6</sub> receptors on cholinergic neurons: implication of multiple neurotransmitter systems in 5-HT<sub>6</sub> receptor-mediated acetylcholine release. *Eur J Neurosci* 24:1299-306.
148. Marshak DR (1990). S100 $\beta$  as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 86:169-81.
149. Martarello L, Ahmed M, Chuang AT, Cunningham VJ, Jakobsen S, Johnson CN, Matthews JC, Medhurst A, Moss SF, Rabiner EA, Ray A, Rivers D, Stemp G, Gee AD (2005). Radiolabelling and *in vivo* evaluation of [<sup>11</sup>C]GSK215083 as a potential 5-HT<sub>6</sub> PET radioligand in the porcine brain. *J Label Compd Radiopharm* 48:S7.
150. Martarello L, Parker C, Cunningham V, Searle G, Rabiner E, Gee A, Davy M, Laruelle M (2008). First evaluation in humans of [<sup>11</sup>C]GSK215083 as a probe to image the 5-HT<sub>6</sub> receptors. *J Nucl Med* 49 (Suppl. 1):79P.
151. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-9.
152. Mathis CA, Simpson NR, Mahmood K, Kinahan PE, Mintun MA (1994). [<sup>11</sup>C]WAY 100635: a radioligand for imaging 5-HT<sub>1A</sub> receptors with positron emission tomography. *Life Sci* 55:PL403-7.

153. Matthes H, Boschert U, Amlaiky N, Grailhe R, Plassat JL, Muscatelli F, Mattei MG, Hen R (1993). Mouse 5-hydroxytryptamine<sub>5A</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>5B</sub> receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol Pharmacol* 43:313-9.
154. Maurel JL, Autin JM, Funes P, Newman-Tancredi A, Colpaert F, Vacher B (2007). High-efficacy 5-HT<sub>1A</sub> agonists for antidepressant treatment: a renewed opportunity. *J Med Chem* 50:5024-33.
155. Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706:181-93.
156. Meston CM, Gorzalka BB (1992). Psychoactive drugs and human sexual behaviour: the role of serotonergic activity. *J Psychoactive Drugs* 24:1-40.
157. McAdory BS, Van Eldik LJ, Norden JJ (1998). S100 $\beta$ , a neurotropic protein that modulates neuronal protein phosphorylation, is upregulated during lesion-induced collateral sprouting and reactive synaptogenesis. *Brain Res* 813:211-7.
158. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005). G-protein signalling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62:551-77.
159. Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ, Reynolds CF (1998). Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology* 18:407-30.
160. Meneses A (2001). Effects of the 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist Ro 04-6790 on learning consolidation. *Behav Brain Res* 118:107-10.
161. Middlemiss D, Palmer A, Edel N, Bowen D (1986). Binding of the novel serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in normal and Alzheimer brain. *J Neurochem* 46:993-6.
162. Miquel MC, Doucet E, Boni C, El Mestikawy S, Matthiessen L, Daval G, Vergé D, Hamon M (1991). Central serotonin<sub>1A</sub> receptors: Respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem Int* 19:453-65.
163. Milak MS, Severance AJ, Ogden RT, Prabhakaran J, Kumar JS, Majo VJ, Mann JJ, Parsey RV (2008). Modeling considerations for <sup>11</sup>C-CUM-101, an agonist radiotracer for imaging serotonin 1A receptor *in vivo* with PET. *J Nucl Med* 49:587-96.
164. Mitchell ES, Neumaier JF (2005). 5-HT<sub>6</sub> receptors: a novel target for cognitive enhancement. *Pharmacol Ther* 108:320-33.
165. Monsma FJ Jr, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR (1993). Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol* 43:320-7.
166. Moore B (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-44.
167. Nagai T, McGeer PL, Peng JH, McGeer EG, Dolman CE (1983). Choline acetyltransferase immunohistochemistry in brains of Alzheimer's disease patients and controls. *Neurosci Lett* 36:195-9.
168. Nishi M, Kawata M, Azmitia EC (1997). S100 $\beta$  promotes the extension of microtubule associated protein2 (MAP2)-immunoreactive neurites retracted after colchicine treatment in rat spinal cord culture. *Neurosci Lett* 229:212-4.
169. Nishi M, Azmitia EC (1999). Agonist- and antagonist-induced plasticity of rat 5-HT<sub>1A</sub> receptor in hippocampal cell culture. *Synapse* 31:186-95.

170. Oleskevich S, Descarries L, Watkins KC, Séguéla P, Daszuta A (1991). Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* 42:777-91.
171. Palacios J, Waeber C, Hoyer D, Mengod G (1990). Distribution of serotonin receptors. *Ann NY Acad Sci* 600:36-52.
172. Passchier J, Van Waarde A, Pieterman RM, Elsinga P, Prium J, Hendrikse HN, Willemsen AT, Vaalburg W (2000). Quantitative imaging of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in healthy volunteers with [<sup>18</sup>F]-MPPF. *Nucl Med Biol* 27:473-6.
173. Passchier J, van Waarde A (2001). Visualisation of serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptors in the central nervous system. *Eur J Nucl Med* 28:113-29.
174. Patel TD, Azmitia EC, Zhou FC (1996). Increased 5-HT<sub>1A</sub> receptor immunoreactivity in the rat hippocampus following 5,7-dihydroxytryptamine lesions in the cingulum bundle and fimbria-fornix. *Behav Brain Res* 73:319-23.
175. Patel TD, Zhou FC (2005). Ontogeny of 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in the developing hippocampus. *Dev Brain Res* 157:42-57.
176. Paxinos G, Watson C (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates, second ed. Academic Press, New York.
177. Pazos A, Palacios JM (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205-30.
178. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999). Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-8.
179. Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B (2001) Current concepts in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 58:1985-92.
180. Pike VW, McCarron JA, Lammertsma AA, Osman S, Hume SP, Sargent PA, Bench CJ, Cliffe IA, Fletcher A, Grasby PM (1996). Exquisite delineation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in human brain with PET and [carbonyl-11 C]WAY-100635. *Eur J Pharmacol* 301:R5-7.
181. Pike VW, Halldin C, Wikström H, Marchais S, McCarron JA, Sandell J, Nowicki B, Swahn CG, Osman S, Hume SP, Constantinou M, Andrée B, Farde L (2000). Radiolignads for the study of brain 5-HT<sub>(1A)</sub> receptors *in vivo* - development of some new analogues of way. *Nucl Med Biol* 27:449-55.
182. Pike VW, Halldin C, Wikström HV (2001). Radioligands for the study of brain 5-HT<sub>1A</sub> receptors *in vivo*. *Prog Med Chem* 38:189-247.
183. Pineiro-Nunez MM, Bauson DD, Bymaster FP (2005). Discovery and SAR studies of 2,6-difluorobenzenesulfonic acid 1-methyl-3-(1-methylpiperidin-4-yl)-1H-indol-5-yl ester, a novel and potent 5-HT<sub>6</sub> antagonist for the treatment of cognitive deficit. 229<sup>th</sup> ACS Natl Meet, Mar 13-17, San-Diego. Abstract MEDI Vol 282.
184. Pineyro G, Blier P (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev* 51:533-91.
185. Plassat JL, Amlaiky N, Hen R (1993). Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 44:229-36.
186. Plénevaux A, Weissman D, Aerts J, Lemaire C, Brihaye C, Degueldra C, Le Bars D, Comar D, Pujol JF, Luxen A (2000). Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of (4-2'-methoxyphenyl)-1-[2'(N-2-pyridinyl)-p-[<sup>18</sup>F]fluorobenzamido]-ethyl]piperazine, p-[<sup>18</sup>F]MPPF, a new serotonin 5-HT<sub>1A</sub> antagonist for positron emission tomography: An *in vivo* study in rats. *J Neurochem* 75:803-11.

187. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12:440-53.
188. Ramos AJ, Rubio MD, Defagot C, Hirschberg L, Villar MJ, Brusco A (2004). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain Res* 1030:201-20.
189. Rbah L (2006). Apports d'un radiopharmaceutique TEP, le [<sup>18</sup>F]-MPPF, dans l'étude de la neurotransmission sérotoninergique. Thèse n°25-2006.
190. Reinikainen KJ, Soininen H, Reikkinen PJ (1990). Neurotransmitter changes in Alzheimer's disease: Implications to diagnosis and therapy. *J Neurosci* 27:576-86.
191. Reynolds GP, Arnold L, Rossor MN, Iversen LL, Mountjoy CQ, Roth M (1984). Reduced binding of [<sup>3</sup>H]ketanserin to cortical 5-HT<sub>2</sub> receptors in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurosci Lett* 44:47-51.
192. Riad M, Garcia S, Watkins K, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000). Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181-94.
193. Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L (2001). Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* 21:8378-86.
194. Riemer C, Borroni E, Levet-Trafit B, Martin JR, Poli S, Porter RHP, Bös M (2003). Influence of the 5-HT<sub>6</sub> receptor on acetylcholine release in the cortex: pharmacological characterization of 4-(2-bromo-6-pyrrolidin-1-ylpyridine-4-sulfonyl) phenylamine, a potent and selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist. *J Med Chem* 46:1273-6.
195. Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, Leslie RA (2002). The distribution of 5-HT<sub>(6)</sub> receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT<sub>(6)</sub> receptor antagonist [<sup>125</sup>I]SB-258585. *Brain Res* 934:49-57.
196. Rogers DC, Robinson TL, Quilter CA, Hunter AJ, Routledge C, Hagan JJ (1999). Cognitive enhancement effects of the selective 5-HT<sub>6</sub> antagonist SB-271046. *Brit J Pharmacol* 127:22P.
197. Rogers DC, Hatcher PD, Hagan JJ (2000). The selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, SB-271046-A, enhances performance of maze tasks in the rat. *Society for Neuroscience Abstracts* 26, 680.
198. Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velazquez M, Acosta-Martinez JP, Ortiz GG (2004). Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus *in vivo*. *J Neuroimmunol* 150:20-8.
199. Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL (1982). A *post-mortem* study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain* 105(Pt. 2):313-30.
200. Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC (1993a). A novel rat serotonin (5-HT<sub>6</sub>) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 193:268-76.
201. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC (1993b). Molecular cloning, characterization, and localisation of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8547-51.
202. Saegis (2005). Pharmaceutical Completes Phase I Clinical Study of SGS518. *Saegis Press Release*.

203. Samuraki M, Ichiro M, Wei-Ping C, et al. (2006). FDG PET in patients with mild Alzheimer's disease before and after correction for cortical atrophy. *J Nucl Med* 47:118P.
204. Sato S, Mizukami K, Asada T (2007). A preliminary open-label study of 5-HT<sub>1A</sub> partial agonist tandospirone for behavioural and psychological symptoms associated with dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:281-3.
205. Scharfman HE (2007). The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:627-37.
206. Schechter LE, Smith DL, Rosenzweig-Lipson S, Sukoff SJ, Dawson LA, Marquis K, Jones D, Piesla M, Andree T, Nawoschik S, Harder JA, Womack MD, Buccafusco J, Terry AV, Hoebel B, Rada P, Kelly M, Abou-Gharbia M, Barrett JE, Childers W (2005). Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1274-89.
207. Schoeffter P, Waeber C (1994). 5-Hydroxytryptamine receptors with a 5-HT<sub>6</sub> receptor-like profile stimulating adenylyl cyclase activity in pig caudate membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 350:356-60.
208. Scott MM, Deneris ES (2005). Making and breaking serotonin neurons and autism. *Int J Dev Neurosci* 23:277-85.
209. Sebben M, Ansanay H, Bockaert J, Dumuis A (1994). 5-HT<sub>6</sub> receptors positively coupled to adenylyl cyclase in striatal neurones in culture. *Neuroreport* 5:2553-7.
210. Seeman P, Guan HC, Niznik HB (1989). Endogenous dopamine lowers the dopamine D<sub>2</sub> receptor density as measured by [<sup>3</sup>H]-raclopride: Implications for positron emission tomography of the human brain. *Synapse* 3:96-7.
211. Setola V, Roth BL (2003). Why mice are neither miniature humans nor small rats: a cautionary tale involving 5-hydroxytryptamine-6 serotonin receptor species variants. *Mol Pharmacol* 64:1277-8.
212. Sheard MH (1969). The effect of p-chlorophenylalanine on behaviour in rats: relation to brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* 2:524-8.
213. Shin RW, Ogino K, Kondo A, Saido TC, Trojanowski JQ, Kitamoto T, Tateishi J (1997). Amyloid beta-protein (Abeta) 1-40 but not Abeta 1-42 contributes to the experimental formation of Alzheimer disease amyloid fibrils in the rat brain. *J Neurosci* 17:8187-93.
214. Shirazi-Southall S, Rodriguez DE, Nomikos GG (2002). Effects of typical and atypical antipsychotics and receptor selective compounds on acetylcholine efflux in the hippocampus of the rat. *Neuropsychopharmacology* 26:583-94.
215. Shiue CY, Shiue GG, Mozley PD, Kung MP, Zhuang ZP, Kim HJ, Kung HF (1997). P-[<sup>18</sup>F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in humans. *Synapse* 25:147-54.
216. Shively CA, Friedman DP, Gage HD, Bounds MC, Brown-Proctor C, Blair JB, Henderson JA, Smith MA, Buchheimer N (2006). Behavioral depression and positron emission tomography-determined serotonin 1A receptor binding potential in cynomolgus monkeys (2006). *Arch Gen Psychiatry* 63:396-403.
217. Sleight AJ, Consolo S, Martin JR, Bös M, Boess FG, Bentley JC, Bourson A (1999). 5-HT<sub>6</sub> receptors: functional correlates and potential therapeutic indications. *Behav Pharmacol* 10:S86.
218. Smith GE, Petersen RC, Parisi JE, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangalos EG, Waring S (1996). Definition, course and outcome of mild cognitive impairment. *Ageing Neuropsychol Cognition* 3:141-7.



219. Snider RS, Niemer WT (1961). A stereotaxic atlas of the cat brain. *Chicago: University of Chicago Press*.
220. Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1990). Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 2:1144-54.
221. Sparks D (1989). Aging and Alzheimer's disease. Altered cortical serotonergic binding. *Arch Neurol* 46:138-40.
222. Sprouse J, Braselton J, Reynolds L (2000). 5-HT<sub>1A</sub> agoniste potential of pindolol: electrophysiologic studies in the dorsal raphe nucleus and hippocampus. *Biol Psych* 47:1050-5.
223. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV (2004). Amyloid- $\beta$ (25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80:647-55.
224. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Lazareva NA, Gulyaeva NV (2006). Studies of the effects of central administration of beta-amyloid peptide (25-35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory. *Neurosci Behav Physiol* 36:101-6.
225. Stéphan A, Laroche S, Davis S (2001). Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *J Neurosci* 21:5703-14.
226. Stéphan A, Laroche S, Davis S (2003). Learning deficits and dysfunctional synaptic plasticity induced by aggregated amyloid deposits in the dentate gyrus are rescued by chronic treatment with indomethacin. *Eur J Neurosci* 17:1921-7.
227. Stéphan A, Phillips AG (2005). A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 4:157-72.
228. Tanzi RE, Bertram L (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120:545-55.
229. Thielen RJ, Frazer A (1995). Effects of novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists on measures of post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation *in vivo*. *Life Sci* 56:PL163-8.
230. Törk I (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600:9-34.; discussion 34-5.
231. Truchot L, Costes SN, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Antérion C, Croisile B, Mercier B, Hermier M, Vighetto A, Krolak-Salmon P (2007). Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment. *Neurology* 69:1012-7.
232. Truchot L, Costes N, Zimmer L, Laurent B, Le Bars D, Thomas-Antérion C, Mercier B, Hermier M, Vighetto A, Krolak-Salmon P (2008). A distinct [<sup>18</sup>F]MPPF PET profile in amnesic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease. *Neuroimage* 40:1251-6.
233. Umbriaco C, Anctil M, Descarries L (1990). Serotonin immunoreactive neurons in the cnidarian, *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol* 291:167-78.
234. Unsworth CD, Molinoff PB (1994). Characterization of a 5-hydroxytryptamine receptor in mouse neuroblastoma N18TG2 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 269:246-55.
235. Van Wijngaarden I, Tulp MT, Soudijn W (1990). The concept of selectivity in 5-HT receptor research. *Eur J Pharmacol* 188:301-12.
236. Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 6:3474-3482.

237. Wang R, Dineley KT, Sweatt JD, Zheng H (2004). Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience* 126:305-12.
238. Ward RP, Hamblin MW, Lachowicz JE, Hoffman BJ, Sibley DR, Dorsa DM (1995). Localization of serotonin subtype 6 receptor messenger RNA in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 64:1105-11.
239. Waterhouse RN (2003). Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol* 5:376-89.
240. Watson J, Collin L, Ho M, Riley G, Scott C, Selkirk JV, Price GW (2000). 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist-antagonist binding affinity difference as a measure of intrinsic activity in recombinant and native tissue systems. *Br J Pharmacol* 130:1108-14.
241. Weinstein D, Magnuson D, Lee J (1996). Altered G-protein coupling of a frontal cortical low affinity [<sup>3</sup>H]8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin serotonergic binding site in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 73:325-9.
242. Wen PH, Shao X, Shao Z, Hof PR, Wisniewski T, Kelley K, Friedrich VL Jr, Ho L, Pasinetti GM, Shioi J, Robakis NK, Elder GA (2002). Overexpression of wild type but not an FAD mutant presenilin-1 promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurobiol Dis* 10:8-19.
243. Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC (1986). [3H]5-hydroxytryptamine binding to brain astroglial cells: differences between intact and homogenized preparations and mature and immature cultures. *J Neurochem* 46:1186-9.
244. Whitaker-Azmitia PM, Lauder JM, Shemmer A, Azmitia EC (1987). Postnatal changes in serotonin<sub>1</sub> receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin<sub>1</sub> receptors. *Dev Brain Res* 33:285-95.
245. Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC (1990a). Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528:155-8.
246. Whitaker-Azmitia PM, Shemer AV, Caruso J, Molino L, Azmitia EC (1990b). Role of high affinity serotonin receptors in neuronal growth. *Ann NY Acad Sci* 600:315-30.
247. Whitaker-Azmitia PM, Clarke C, Azmitia EC (1993). Localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. *Synapse* 14:201-5.
248. Wiklund L, Björklund A (1980). Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res* 191:109-27.
249. Wiklund L, Léger L, Persson M (1981). Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J Comp Neurol* 203:613-47.
250. Wilson CC, Faber KM, Haring JH (1998). Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT<sub>1a</sub> receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain Res* 782:235-9.
251. Wilson AA, Jin L, Garcia A, DaSilva JN, Houle S (2001). An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl Radiat Isot* 54:203-8.
252. Woolley ML, Bentley JC, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KCF (2001). A role for 5-HT<sub>6</sub> receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology* 41:210-9.

253. Woolley ML, Marsden CA, Sleight AJ, Fone KC (2003). Reversal of a cholinergic-induced deficit in a rodent model of recognition memory by the selective 5-HT<sub>6</sub> receptor antagonist, Ro 04-6790. *Psychopharmacology* 170:358-67.
254. Woolley ML, Marsden CA, Fone KC (2004). 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:59-79.
255. Wu Q-Y, Li J, Feng Z-T, Wang T-H (2007). Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett* 417:281-5.
256. Yamamoto T, Hirano A (1985). Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann Neurol* 17:573-7.
257. Yocca FD (1990). Neurochemistry and neurophysiology of buspirone and gepirone: Interactions of presynaptic and postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *J Clin Psychopharmacol* 10:6S-12S.
258. Zgombick JM, Schechter LE, Macchi M, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1992). Human gene S31 encodes the pharmacologically defined serotonin 5-hydroxytryptamine 1E receptor. *Mol Pharmacol* 42:180-5.
259. Zhou FC, Azmitia EC (1983). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine on HRP retrograde transport from hippocampus to midbrain raphe nuclei in the rat. *Brain Res Bull* 10:445-51.
260. Zhou FC, Azmitia EC (1984). Induced homotypic collateral sprouting of serotonergic fibers in hippocampus. *Brain Res* 308:53-62.
261. Zhou FC, Azmitia EC (1986). Induced homotypic sprouting of serotonergic fibers in hippocampus. II. An immunocytochemistry study. *Brain Res* 373:337-48.
262. Zhou LX, Zhang GL (1986). [Serotonergic and non-serotonergic neurons in the raphe nuclei of the brain stem] *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 17:43-7.
263. Zhou P, Yan Y, Bernotas R, Harrison BL, Huryn D, Robichaud AJ, Zhang GM, Smith DL, Schechter LE (2005). 4-(2-Aminoethoxy)-N-(phenylsulfonyl)indoles as novel 5-HT<sub>6</sub> receptor ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 15:1393-6.
264. Zhuang ZP, Kung MP, Kung HF (1994). Synthesis and biological evaluation of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl]piperazine (p-MPPI): a new iodinated 5-HT<sub>1A</sub> ligand. *J Med Chem* 37:1406-7.
265. Zimmer L, Rbani L, Giacomelli F, Le Bars D, Renaud B (2003). A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT<sub>1A</sub> PET ligand <sup>18</sup>F-MPPF binding in the rat hippocampus. *J Nucl Med* 44:1495-501.
266. Zweig RM, Ross CA, Hedreen JC, Steele C, Cardillo JE, Whitehouse PJ, Folstein MF, Price DL (1988). The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 24:233-42.

---

## TITRE

Vers l'imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique dans la maladie d'Alzheimer : du radiotraceur au modèle animal.

---

## RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) est une démence neurodégénérative dont, à l'heure actuelle, aucune thérapeutique curative ne peut être proposée aux patients. L'étiologie de la MA demeure inconnue mais ses caractéristiques physiopathologiques sont bien décrites. Alors que les dégénérescences intracellulaires de protéines tau sont corrélées au déclin cognitif, il est admis que l'accumulation extracellulaire de peptides amyloïdes s'installe plusieurs années avant que des signes cliniques apparaissent. D'autre part, il existerait un continuum progressif entre l'apparition des premiers troubles cognitifs (stade MCI pour "mild cognitive impairment") et le développement d'une MA. Des processus neurotoxiques silencieux se développent donc bien avant que le diagnostic soit porté par des tests neuropsychologiques en clinique.

Ainsi, la précocité et la spécificité du diagnostic constituent des facteurs cruciaux tant pour la prise en charge de la MA que pour l'évaluation de nouvelles thérapeutiques. Les travaux effectués au cours de cette thèse se positionnent dans cette optique d'un diagnostic précoce, par le développement des méthodologies de l'imagerie TEP (tomographie par émissions de positons).

Une première partie, méthodologique, a consisté à automatiser et à optimiser la radiosynthèse du [<sup>11</sup>C]PIB, un radiotraceur pouvant détecter l'accumulation des peptides amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de la MA. Cette approche permet de synthétiser ce radiotraceur TEP plusieurs fois par jour si l'activité préclinique et/ou clinique le nécessite.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'imagerie TEP de la neurotransmission sérotoninergique en nous focalisant sur les récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>6</sub> et 5-HT<sub>1A</sub>.

Les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>6</sub> ont démontré des propriétés procognitives, processus particulièrement affectées dans la MA. D'autre part, des études *post-mortem* montrant leur modification confirment qu'il s'agit d'une cible pertinente dans le cadre de la MA. Cependant, aucun centre ne dispose encore d'un radiotraceur spécifique permettant l'imagerie TEP *in vivo* de ces récepteurs. Nous rapportons dans cette étude, l'évaluation biologique chez le rat et le chat sain, d'un radiotraceur antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>6</sub>, le [<sup>18</sup>F]12ST05.

D'autre part, une étude récente en imagerie TEP au [<sup>18</sup>F]MPPF, un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, a révélé une diminution de la fixation de ce traceur chez des patients Alzheimer alors qu'une augmentation pouvait être constatée chez des patients MCI. Nos travaux ont réussi à reproduire une surexpression transitoire des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> chez des rats sains auxquels on a injectés 7 jours auparavant des peptides amyloïdes Aβ (1-40) dans l'hippocampe dorsal. De plus, l'évaluation neuroanatomique longitudinale du modèle nous a permis de proposer différents mécanismes compensatoires pouvant expliquer l'augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

Ces derniers résultats précliniques apportent des informations sur la nature des phénomènes compensatoires précoces constatés en clinique chez des patients MCI et pourraient avoir des conséquences sur les thérapeutiques ayant pour but d'agir sur les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>.

---

## DISCIPLINE

Neurosciences

---

## MOTS-CLES

Alzheimer, TEP, [<sup>11</sup>C]PIB, [<sup>18</sup>F]MPPF, [<sup>18</sup>F]12ST05, sérotonine, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>

---

## INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

FRE CNRS 3006 Pharmacologie et Imagerie de la neurotransmission sérotoninergique; Faculté de Pharmacie, Site Santé Rockefeller, 8 av Rockefeller 69373 Lyon Cedex 08